



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Efecto anti-tirosinasa de extractos metanólico y etil
acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck
Var. huando (naranja)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Mercedes Elizabeth CONDO RAMIREZ

Janeth Milagros QUISPE DEL CAMPO

ASESOR

Mg. Carmen Gladys PEÑA SUASNABAR

Dra. Elena Rafaela BENAVIDES RIVERA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Condo M, Quispe J. Efecto anti-tirosinasa de extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	Efecto anti-tirosinasa de extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck Var. huando (naranja)
Área de investigación (*)	Ciencias Bioquímicas
Líneas de Investigación (*)	Biotecnología de enzimas
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	Jr. Puno 1002 - Lima
Año o rango de años que abarcó	Septiembre de 2018 a Marzo de 2019
DATOS DEL TESISISTA I	
Apellidos y Nombres	CONDO RAMIREZ MERCEDES ELIZABETH
Número de matrícula	10040010
Indicar si es egresado	Egresada
DATOS DEL TESISISTA II	
Apellidos y Nombres	QUISPE DEL CAMPO JANETH MILAGROS
Número de matrícula	10040087
Indicar si es egresado	Egresada
DATOS DEL ASESOR I	
Apellidos y nombres	Peña Suasnabar Carmen Gladys
Código docente: OA2038	Categoría: ASOCIADA Clase: TC 40h.
Máximo grado alcanzado	MAGISTER
Código ORCID (obligatorio)	0000-0001-5061-4527
Título profesional	QUÍMICA FARMACÉUTICA
Departamento Académico al que pertenece	Departamento Académico de Bioquímica

Instituto de Investigación al que pertenece	Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo"
Grupo de investigación al que pertenece	BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA Y SALUD (BIOMIAS)
Indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	MIEMBRO (TITULAR)
DATOS DEL ASESOR II	
Apellidos y nombres	Benavides Rivera Elena Rafaela
Código docente: 00796A	Categoría: ASOCIADA Clase: TC 40h.
Máximo grado obtenido	DOCTORA
Título profesional	QUÍMICA FARMACÉUTICA
Código ORCID (obligatorio)	0000-0003-0929-9574
Departamento Académico al que pertenece	Departamento Académico de Bioquímica
Instituto de Investigación al que pertenece	Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo"
Grupo de investigación al que pertenece	BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA (BIOTOX)
Indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	MIEMBRO (ADJUNTO EXTERNO)

(*) Según documentos oficiales de la Facultad



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Efecto anti-tirosinasa de extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja)

Que presentan las Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**MERCEDES ELIZABETH CONDO RAMIREZ Y
JANETH MILAGROS QUISPE DEL CAMPO**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

SOBRESALIENTE 18

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 25 de noviembre de 2019


Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
Presidente


Dr. Américo Jorge Castro Luna
Miembro


Mg. Gloria Clotilde Gordillo Rocha
Miembro


Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



AGRADECIMIENTOS

A nuestra asesora Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar y a nuestra co-asesora Dra. Elena Rafaela Benavides Rivera, por la orientación, paciencia, motivación y confianza durante la elaboración de la tesis.

A los miembros del jurado examinador y calificador por el tiempo otorgado en la revisión de nuestra tesis y por sus valiosas recomendaciones.

Al Dr. Cesar Fuertes Ruitón y su equipo de investigación por el apoyo brindado en el desarrollo de la presente tesis.

A la Dra. Yadira Fernández por permitirnos el uso de los ambientes del Laboratorio de Biología Molecular y los equipos necesarios para el desarrollo de la presente tesis.

A todos los miembros de nuestra querida Facultad, por su labor y dedicación en la formación de profesionales íntegros.

A nuestros padres y hermanos por ser fuente de motivación y apoyo incondicional durante el desarrollo de nuestras carreras y nuestras vidas.

RESUMEN

Se evaluó el efecto anti-tirosinasa de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) sobre la actividad de la enzima tirosinasa de hongos, mediante métodos cromatográfico y espectrofotométrico de referencia. El análisis fitoquímico se realizó a partir de los extractos metanólico y etil acetato obtenidos por maceración del epicarpio, posterior evaporación y re-suspensión. Los resultados obtenidos mediante tamizaje fitoquímico mostraron presencia de alcaloides, quinonas, flavonoides y polifenoles. La determinación cualitativa del efecto inhibitorio de la enzima tirosinasa o efecto anti-tirosinasa se realizó por cromatografía en capa fina usando estándar de ácido kójico al 0,05 % como control positivo, revelándose con aspersion de L-tirosina a 0,1mM y tirosinasa 1000 U/mL. Las manchas blancas sobre el fondo oscuro de la placa evidenciaron el efecto anti-tirosinasa causado por ambos extractos. La determinación del porcentaje de inhibición por método espectrofotométrico de los extractos metanólico y etil acetato preparados a concentración de 5mg/mL, expresaron 44,3% y 105,4% de inhibición respectivamente; mientras los valores IC₅₀ para dichos extractos y el estándar de ácido kójico fueron de 5,23 mg/mL; 1,54 mg/mL y 0,023 mg/mL respectivamente. En conclusión, los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) demostraron efecto anti-tirosinasa de interés en la industria cosmética y en los tratamientos antimelanogénicos.

Palabras clave: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja), efecto anti-tirosinasa, inhibidor de tirosinasa, porcentaje de inhibición, IC₅₀.

SUMMARY

The anti-tyrosinase effect of the methanolic and ethyl acetate extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (orange) epicarp on the activity of the fungal tyrosinase enzyme was evaluated by reference chromatographic and spectrophotometric methods. The phytochemical analysis was performed from the methanolic and ethyl acetate extracts obtained by maceration of the epicarp, subsequent evaporation and re-suspension. The results obtained by phytochemical screening has shown the presence of alkaloids, quinones, flavonoids and polyphenols. The qualitative determination of the inhibitory effect of the tyrosinase enzyme or anti-tyrosinase effect was performed by thin layer chromatography using standard 0,05 % kojic acid as a positive control, revealing with spray of L-tyrosine at 0,1mM and tyrosinase 1000 U/mL The white spots on the dark background of the plaque showed the anti-tyrosinase effect caused by both extracts. The determination of the percentage of inhibition by spectrophotometric method of methanolic and ethyl acetate extracts prepared at a concentration of 5 mg/ml, expressed 44,3% and 105,4% inhibition respectively; while the IC₅₀ values for said extracts and standard of kojic acid were 5,23 mg/ml; 1,54 mg/ml and 0,023 mg/ml respectively. In conclusion, the methanolic extracts and ethyl acetate of the epicarp of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. When (orange) demonstrated anti-tyrosinase effect of interest in the cosmetic industry and in antimelanogenic treatments.

Keywords: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja), anti-tyrosinase effect, tyrosinase inhibitor, percent inhibition, IC₅₀.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
Lista de Abreviaturas	vi
Lista de Tablas	vii
Lista de Figuras	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	2
3. OBJETIVOS	2
3.1. Objetivo general	2
3.2. Objetivos específicos	2
4. MARCO TEÓRICO	3
4.1. Aspectos botánicos	3
4.1.1. Clasificación taxonómica	3
4.1.2. Descripción morfológica	3
4.1.3. Origen, hábitat y distribución geográfica	6
4.1.4. Beneficios de los cítricos	7
4.1.5. Usos Tradicionales	7
4.2. Aspectos bioquímicos	8
4.2.1. Compuestos activos de <i>Citrus sinensis</i>	8
4.3. Piel e hiperpigmentación	8
4.3.1. Estructura de la piel	8
4.3.2. Pigmentación de la piel y melanogénesis	10
4.3.3. Alteraciones de la pigmentación de la piel	22
4.3.4. Sustancias despigmentantes de la piel	25
4.4. Efecto anti-tirosinasa	27
4.4.1. Enzimas e inhibidores enzimáticos	27
4.4.2. Productos naturales inhibidores de la enzima tirosinasa	30

5. METODOLOGÍA	
5.1. Tipo de investigación	31
5.2. Materiales, equipos y reactivos	31
5.2.1. Material botánico	31
5.2.2. Materiales de laboratorio	31
5.2.3. Equipos	32
5.2.4. Reactivos	32
5.3. Colecta del material botánico	33
5.4. Clasificación Taxonómica	33
5.5. Tratamiento de la muestra y preparación de extractos	33
5.6. Identificación de componentes de los extractos de epicarpio de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck Var. huando (naranja): tamizaje fitoquímico	34
5.7. Determinación del efecto anti-tirosinasa de los extractos del epicarpio de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck Var. huando (naranja)	35
5.8. Comparación del efecto anti-tirosinasa de los extractos del epicarpio de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck Var. huando (naranja) con el obtenido por ácido kójico	36
5.9. Análisis estadístico	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Rendimiento de la extracción	41
6.2. Composición fitoquímica de los extractos del epicarpio de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck Var. huando (naranja)	41
6.3. Efecto anti-tirosinasa de los extractos del epicarpio de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck Var. huando (naranja)	42
7. DISCUSIÓN	48
8. CONCLUSIONES	54
9. RECOMENDACIONES	55
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
11. ANEXOS	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AK: Ácido kójico
ANOVA: Análisis de varianza complejo
ES: Complejo enzima-sustrato
CCF: Cromatografía en capa fina
Cu: Cobre
DCT: Dopacromo tautomerasa
DHI: 5,6- dihidroxiindol
DHICA: 5,6- dihidroxiindol-2-ácido carboxílico
DMS: Diferencia mínima significativa
DMSO: Dimetilsulfóxido
EEA: Extracto etil acetato
EM: Extracto metanólico
FeCl₃: Tricloruro férrico
FCE: Factor de crecimiento epidérmico
HCl: Ácido clorhídrico
HPI: Hiperpigmentación postinflamatoria
IC50: Concentración mínima para 50 % de inhibición
L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina
% I: porcentaje de inhibición
NaCl: Cloruro de Sodio
RER: Retículo endoplásmico rugoso
TRP1: Proteína relacionada con la tirosinasa 1
TRP2: Proteína relacionada con la tirosinasa 2
UPLC: Cromatografía Líquida de Ultra Performance
UV: Ultravioleta
UV-B: Ultravioleta B

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Etapas de desarrollo de un melanosoma.

Tabla 2. Clasificación de fototipos según Fitzpatrick.

Tabla 3. Clasificación de las alteraciones de la pigmentación de la piel.

Tabla 4. Pruebas de identificación fitoquímica.

Tabla 5. Preparación de cubetas para verificación espectrofotométrica.

Tabla 6. Preparación de la microplaca para el ensayo espectrofotométrico.

Tabla 7. Porcentaje de rendimiento de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) a partir de muestra seca.

Tabla 8. Identificación fitoquímica de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja).

Tabla 9. Efecto anti-tirosinasa de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) al 2 %.

Tabla 10. Recuento de resultados en tabla cruzada de Muestras vs Resultados (Efecto anti-tirosinasa) de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) 2 %.

Tabla 11. Estadístico descriptivo chi cuadrado con significación asintótica bilateral 0,00 (menor a 0,05 para intervalo de confianza de 95%).

Tabla 12. Resultados de la absorbancia del complejo dopacromo (L-tirosina y tirosinasa) y la absorbancia del sustrato L-tirosina en función del tiempo.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición e IC₅₀ del estándar de ácido kójico.

Tabla 14. Efecto anti-tirosinasa e IC₅₀ del extracto metanólico del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja).

Tabla 15. Efecto anti-tirosinasa e IC₅₀ del extracto etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Naranja variedad Navel

Figura 2. Naranja variedad Sanguinelli

Figura 3. Naranja variedad Sucreña

Figura 4. Estructura de la piel y sus partes

Figura 5. Ubicación de melanocito epidérmico

Figura 6. Estructura de un melanocito.

Figura 7. Enzima tirosinasa.

Figura 8. Esquema de la proteína tirosinasa humana.

Figura 9. Estado de oxidación del cobre de la enzima tirosinasa.

Figura 10. Reacción 1 - Oxidación de L-tirosina a L-DOPA. Oxidación de monofenoles o actividad cresolasa.

Figura 11. Reacción 2 - Oxidación de L-DOPA a Dopaquinona. Actividad catecolasa.

Figura 12. Bioquímica de la melanogénesis

Figura 13. Inhibición enzimática competitiva y no competitiva.

Figura 14. Ubicación de las muestras en placa cromatográfica.

Figura 15. Absorbancia lograda por el complejo dopacromo y el sustrato de tirosina en función del tiempo.

Figura 16. Curvas logarítmicas de porcentaje de Inhibición de las soluciones de trabajo versus concentración de las mismas.

1. INTRODUCCIÓN

La hiperpigmentación de la piel puede ser causada por diversos factores como las hormonas, el envejecimiento, la exposición a algunos productos químicos y la radiación solar. Dicho síntoma se origina en el organismo por sobreactividad de la enzima tirosinasa, la cual cataliza la conversión de fenilalanina en L-DOPA, compuesto precursor de la melanina pigmento principal de la coloración de la piel.

Para muchas personas la irregularidad en la pigmentación de la piel llega a ser un problema de salud a nivel cosmético sobre todo cuando ésta se presenta en zonas visibles del cuerpo, por ello existe interés en desarrollar productos nuevos para su tratamiento.

Algunas sustancias naturales como polifenoles, flavonoides y otros metabolitos poseen propiedad inhibitoria de la enzima tirosinasa o efecto anti-tirosinasa. Plantas de la familia Rutaceae género *Citrus* son una fuente importante de vitamina C, flavonoides y minerales que además favorecen el sistema nervioso, muscular y la conservación de huesos y dientes. Se conoce que partes del fruto de los cítricos que frecuentemente se desechan: la cáscara (epicarpio) y el albedo (mesocarpio), actúan como inhibidores de la tirosinasa.

El presente estudio ha evaluado la capacidad de inhibir la enzima tirosinasa a partir de extractos metanólico y etil acetato proveniente del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja).

2. HIPÓTESIS

Los extractos metanólico y etil acetato de epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) poseen efecto anti-tirosinasa sobre la actividad de la enzima tirosinasa.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto anti-tirosinasa de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) sobre la actividad de la enzima tirosinasa.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1.** Obtener extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) e identificar los metabolitos presentes en dichos extractos.
- 3.2.2.** Determinar el efecto inhibitorio (anti-tirosinasa) de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) sobre la actividad de la enzima tirosinasa.
- 3.2.3.** Comparar el efecto anti-tirosinasa de los extractos del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) con el obtenido por ácido kójico sobre la actividad de la enzima tirosinasa.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Aspectos botánicos

4.1.1. Clasificación taxonómica

Los cítricos pertenecen a la familia Rutaceae que agrupa a varios géneros y especies, comprende seis subfamilias, siendo la subfamilia Aurantioideae la que contiene a los cítricos y géneros afines.¹

La identificación taxonómica de la planta de naranja variedad agronómica huando según el Sistema Integrado de Clasificación Angiospermas de Arthur Cronquist (1981)² es la siguiente (Anexos 1 y 2):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Género: *Citrus*

Especie: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

4.1.2. Descripción morfológica

El árbol del género *Citrus* tiene copa redonda que puede llegar a medir hasta 15 metros de altura. Tiene una corteza color castaño con surcos finos, ligeramente amargo, puede llegar a tener hasta 20 cm de diámetro. Presentan una espina aguda y delgada de menos de 0.5 cm de largo en el nudo de sus ramas^{1,3}.

El árbol del género *Citrus* tiene hojas oblongas a elípticas, que terminan en punta corta o redondeada con pecíolo de ala angosta. Sus hojas alternas tienen un pecíolo verde de más 1 cm de largo unido al limbo. Presenta una lámina con numerosos puntos glandulares de color verde oscuro a verde amarillento, ligeramente brillante en el haz y de un color verde claro en el envés^{1,3}.

Las flores del árbol del género *Citrus* tiene un cáliz de color blanco verdoso con cinco sépalos¹, tiene cinco pétalos fragrantés de color blanco extendidos y direccionados hacia atrás con hasta 25 estambres de color blanco, tiene un ovario redondo de color verde amarillento, un estilo delgado y un estigma redondeado³.

El fruto es redondo de color anaranjado en su etapa madura, su textura varía de lisa a rugosa¹, el fruto puede medir entre 6 a 9 cm de diámetro, tiene una cáscara suave de menos de 0,5 cm de espesor, su sabor puede variar de dulce a ligeramente agrio³.

Citrus sinensis: las mezclas entre híbridos, especies primitivas de mandarinas y zamboas dan lugar a las variedades de *Citrus sinensis*. El gran número de variedades de naranjos dulces existentes se clasifica en cuatro grupos: grupo Blancas, grupo Navel, grupo Sangre y grupo Sucreñas¹.

- **Grupo Blancas**: en este grupo están incluidas todas aquellas naranjas que no tienen ombligo, son de pigmentación roja y tienen una escasa acidez. Los árboles de este grupo de naranjas tienen pequeñas espinas en las ramas y sus flores presentan anteras amarillas con gran cantidad de polen. Su importancia radica en la elaboración de zumo industrial. El contenido en limonina es claramente inferior a las del grupo navel¹ y prácticamente indetectable por el paladar humano. Las variedades más destacables son valencia, pera y salustiana.
- **Grupo Navel**: este grupo de naranjas son originadas por una mutación única. Son árboles de tamaño medio a grande, en las ramas tiene pequeñas espinas que van desapareciendo a medida que el árbol crece. Sus flores presentan anteras de color amarillo pálido o blanco, lo que indica ausencia de granos de polen¹. La característica de las naranjas navel es que presentan un pequeño fruto rudimentario en la zona estilar

que se asemeja a un ombligo (navel)⁴ y carecen de semillas (Figura 1). Las variedades más destacables son navelina, Washington navel y lanelate.



Figura 1. Naranja variedad Navel¹

- **Grupo Sangre:** las naranjas de este grupo se caracterizan por contener pigmentos rojos (antocianinos) presentes en la corteza, la pulpa y el zumo lo que le da un sabor y aroma característico (Figura 2). Para desarrollar esta coloración característica necesitan de temperaturas bajas. Los árboles de este grupo a diferencia del grupo de las naranjas blancas son más pequeños y sus hojas son más pequeñas. Las anteras de sus flores son amarillas. Las variedades más destacables son tarocco y sanguinelli¹.



Figura 2. Naranja variedad Sanguinelli¹

- **Grupo Sucreñas:** este grupo de naranjas (Figura 3) se diferencian de las demás por tener un contenido en ácido extremadamente bajo. Su

importancia comercial es prácticamente nula. Las variedades más destacables son sucreña o imperial⁽¹⁾.



Figura 3. Naranja variedad Sucreña¹

4.1.3. Origen, distribución geográfica y hábitat

Geográficamente el origen del género *Citrus* se sitúa en el sureste de Asia y el centro de China, Filipinas y el archipiélago Indomalayo hasta Nueva Guinea. La naranja y la mandarina parecen provenir de China e Indochina⁵.

La naranja y el limón fueron introducidos en la región africana del Mediterráneo en el siglo X por los árabes, los portugueses introdujeron el naranjo en el hoy mediterráneo europeo a principios del año 1400; ya en 1556 los españoles traen la variedad de naranja dulce a América⁵.

El cultivo de los cítricos se desarrollan en casi todas las regiones del mundo dentro de la banda delimitada por la línea 40° de latitud Norte y Sur⁶. Se cultiva extensamente en regiones tropicales y subtropicales, y también se encuentra naturalizada en Las Bermudas e Indias Occidentales y en la parte subtropical de los Estados Unidos desde Florida hasta California, y al sur hasta Argentina³.

4.1.4. Beneficios de los cítricos

Las naranjas así como otras plantas del género *Citrus* son excelentes fuentes de vitamina C y contienen potentes antioxidantes naturales, ácido fólico, fibra dietética así como otros componentes bioactivos, como carotenoides y flavonoides que previenen el cáncer y las enfermedades degenerativas⁴.

Las naranjas además contienen compuestos con actividad antiinflamatoria debido a la presencia de enzimas reguladoras (proteína quinasa C, fosfodiesterasa, fosfolipasa, lipoxigenasa y ciclooxigenasa)⁴ que controlan la formación de mediadores biológicos responsables de la activación de células endoteliales y células especializadas involucradas en inflamación.

Los flavonoides de los cítricos neutralizan los radicales libres que promueven mutaciones cuando se generan cerca del ADN, lo protegen del daño por su capacidad para absorber la luz ultravioleta⁴. Los flavonoides de los cítricos pueden prevenir el cáncer por medio de citotoxicidad selectiva, acciones antiproliferativas y apoptosis.

4.1.5. Usos Tradicionales

Uno de los principales usos de los cítricos es la producción de una gran variedad de productos tales como: jugos concentrados y congelados, jugos enlatados y polvo de jugo deshidratado. Además también se obtiene otros productos de la industrialización como: pectina, mermeladas, pulpa seca para forraje, melaza y los aceites de la cáscara y semilla⁷.

Las flores son usadas en la industria del perfume.

En China es un ingrediente de la medicina tradicional.

En la época de floración se obtiene una miel de excelente calidad, denominada miel de azahar.

4.2. Aspectos bioquímicos

4.2.1. Compuestos activos de *Citrus sinensis*

En la composición cabe destacar que es fuente importante de antioxidantes como ácido ascórbico, ácidos hidroxicinámicos, ferúlico, caféico y p-cumárico. También está compuestos por ácidos orgánicos como el ácido málico y el ácido cítrico, que es el más abundante. Además es fuente de folatos, que contribuyen a la formación de células sanguíneas. *Citrus sinensis* aporta carotenoides como b-criptoxantina, luteína y zeaxantina, estas dos últimas sin actividad provitamínica-A. Otros metabolitos presentes en *Citrus sinensis* son los flavonoides, entre los más representativos están la hesperidina, neoshesperidina, naringina, narirutina, tangeretina y nobiletina⁸.

4.3. Piel e hiperpigmentación

4.3.1. Estructura de la piel

La piel presenta múltiples funciones para el organismo como de impermeabilización, protección, absorción de radiación UV, termorregulación, producción de vitamina D y además participa en la detección de estímulos sensoriales⁹.

La piel es el órgano más grande y pesado del cuerpo está formada por diferentes tejidos. En una persona adulta cubre un área de 1,5 a 2,0 m² y representa casi el 15% del peso total del cuerpo¹⁰. Su composición química está formada preponderantemente de agua en un 70%; de minerales como sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro; de carbohidratos como glucosa; de lípidos en especial colesterol y de proteínas como colágeno y queratina¹¹.

La piel humana está estructurada con tres capas distintas tal como se indica en la Figura 4: epidermis, dermis e hipodermis, cada una de ellas con diversos grados de especialización^{10,12}.

La Epidermis: es la capa superficial de la piel, la zona más externa está conformada de células muertas. Está compuesta por un epitelio poliestratificado queratinizante del que surgen los folículos pilosebáceos, las glándulas sudoríparas ecrinas, las glándulas apocrinas y las uñas⁹. En la capa basal de la epidermis es donde se sintetiza el pigmento melanina¹³.

La Dermis: principalmente compuesta por colágeno y elastina. En esta capa fibrosa se encuentran elementos celulares y otros constituyentes propios, así como nervios, vasos sanguíneos y linfáticos⁹.

La Hipodermis: es la capa más profunda de la piel denominada también como capa subcutánea une la dermis al músculo subyacente. En esta capa se ubica el tejido conectivo aerolar laxo, los tejidos conectivos elásticos y adiposos y las terminaciones nerviosas además de los vasos sanguíneos¹⁴.

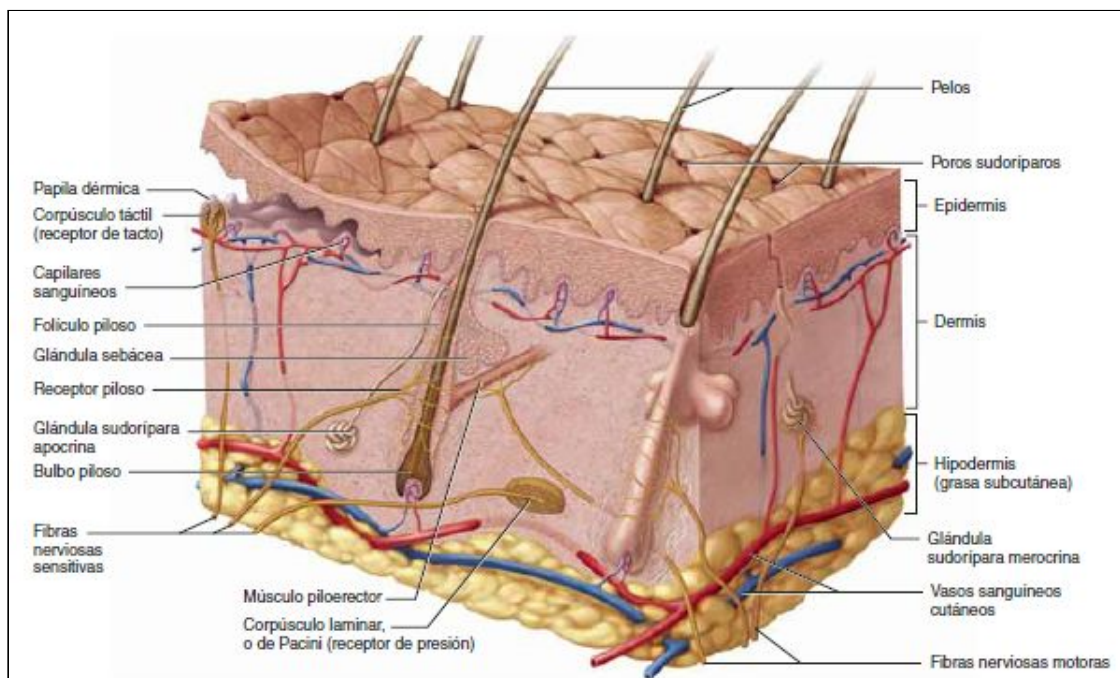


Figura 4. Estructura de la piel y sus partes¹⁰.

4.3.2. Pigmentación de la piel y melanogénesis

Pigmentación de la Piel

La pigmentación de la piel es una característica individual compleja ya que su color está determinado por la interacción de varios genes y el medio ambiente¹⁵.

En la piel se combinan colores como pardo, amarillo, rojo y azul producidos en el organismo de forma natural (biocromos)¹⁶:

- El amarillo es producido por carotenoides y bilis no metabolizada.
- El pardo es producido por la melanina, el pigmento principal de individualización en la coloración humana¹³.
- El rojo es producto de la hemoglobina oxigenada que circula en capilares y arteriolas.
- El azul es producto de la hemoglobina desoxigenada que circula en capilares y vénulas.

La pigmentación parda que es otorgada por la melanina es el biocromo que determina el color que se observa en cada individuo, los pigmentos melánicos se forman en células especializadas, melanocitos, de la capa basal de la epidermis¹⁷.

Melanina

Las melaninas son biopolímeros policíclicos originados del aminoácido tirosina seguido de reacciones reversibles de óxido reducción entre quinonas y sus estados de oxidación, en su estructura presenta al 5,6-indolquinona como monómero más abundante. Las melaninas se encuentran presentes en todos los niveles filogenéticos en forma extracelular o intracelular^{18,19} y son clasificados en tres grandes grupos:

Eumelaninas: brindan una coloración castaño oscuro a negro, son moléculas insolubles nitrogenadas y derivan del aminoácido tirosina a través de un mecanismo de eliminación de átomos de oxígeno vía indolquinona. Absorben la radiación UV-B²⁰.

Feomelaninas: son pigmentos de color amarillo o rojo, son solubles en medios alcalinos y derivan de la tirosina a partir de un desvío de la vía de la ruta de las eumelaninas, a la cual se agrega cisteína y glutatión por ello contiene azufre. Tiene una poca capacidad para filtrar la radiación UV.

Alomelaninas: son pigmentos típicos de plantas y microorganismos, son pigmentos negros originados de precursores libres de nitrógeno¹⁸.

La melanina tiene numerosas propiedades beneficiosas para el cuerpo como son absorber y dispersar la luz UV, eliminar radicales libres, participar en reacciones de oxidación-reducción acopladas y en el almacenamiento de iones²¹.

Melanocitos

Los melanocitos son células dendríticas especializadas derivadas de células inmaduras, las precursoras de las células de Schwann que también se hallan en las fibras nerviosas cutáneas²², se localizan en la capa basal de la epidermis (Figura 5) y en folículos pilosos. El origen embrionario de los melanocitos epidérmicos y del cabello es el mismo, pero su desarrollo es distinto. Los melanocitos de la epidermis mantienen una proporción estable de por vida de 1:5 con los queratinocitos basales²³.

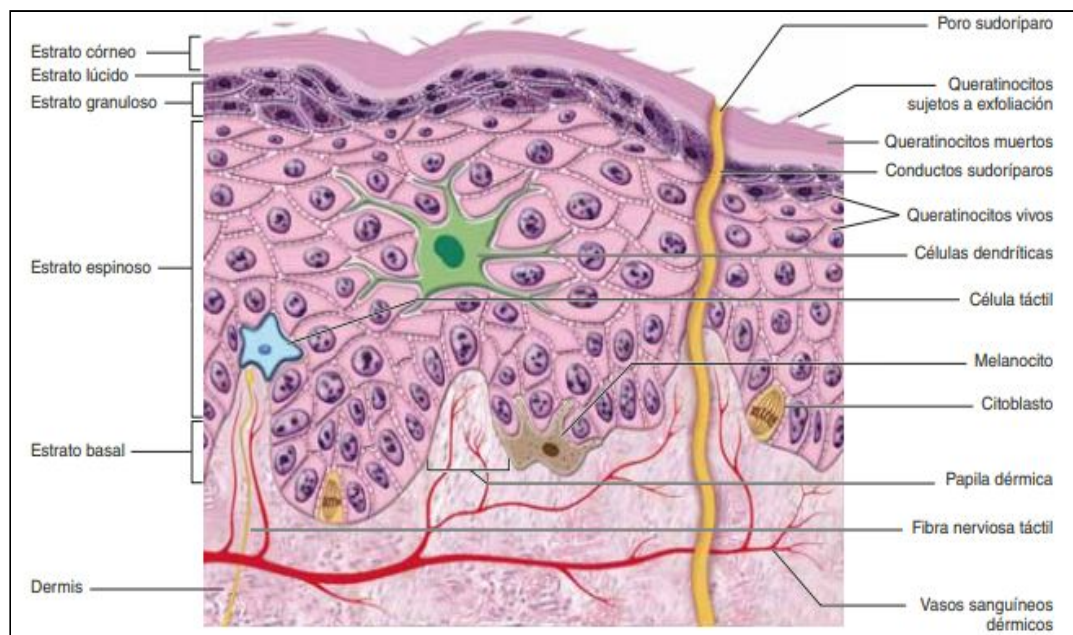


Figura 5. Ubicación de melanocito epidérmico¹⁰

Los melanocitos maduros presentan largas prolongaciones dendríticas que se ramifican entre los queratinocitos vecinos (Figura 6), por medio de estas prolongaciones, cada melanocito entra en contacto con alrededor de 30 a 40 queratinocitos y esto constituye la unidad de melanina epidérmica. La unidad melanina epidérmica permite que el melanocito transporte melanosomas que contienen pigmentos de melanina lo que determina la pigmentación de la piel y ayuda a proteger contra los efectos dañinos de la radiación ultravioleta²⁴.

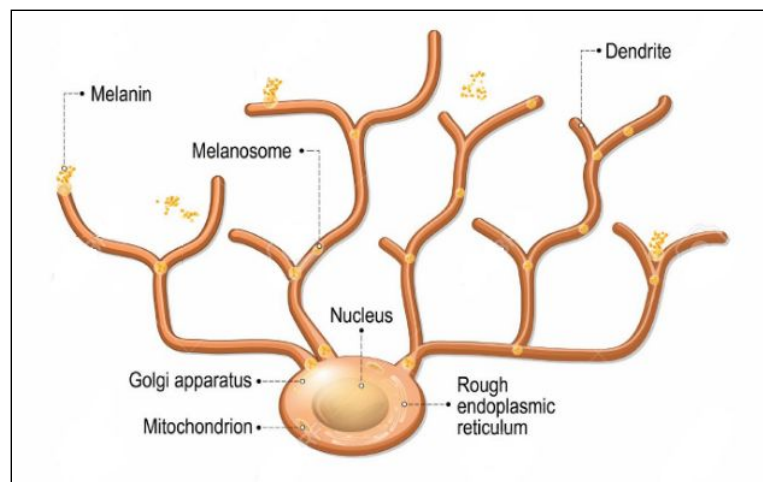


Figura 6. Estructura de un melanocito²⁵

En los melanocitos se lleva a cabo una cadena de reacciones catalizadas por diferentes enzimas que transforma la tirosina en melanina (eumelanina o feomelanina), proceso denominado melanogénesis.

La eumelanina es de color marrón o negro, de peso molecular elevado, insoluble en la mayoría de disolventes mientras la feomelanina es de color amarillo anaranjado y es soluble en las bases; distribuidas en proporciones diferentes en el ser humano²⁶.





Melanosomas

Los melanosomas son organelas citoplasmáticas que contiene enzimas y otras proteínas que sintetizan melanina; se pueden dividir en eumelanosomas y

feomelanosomas. Los eumelanosomas son grandes (aprox. de 0,9 x 0,3um) de forma elíptica contienen una matriz glucoproteica fibrilar altamente estructurada requerida para la síntesis de eumelanina. Los feomelanosomas son más pequeños (aprox. de 0,7 um de diámetro), tienen forma esférica y tienen una matriz glucoproteica desorganizada y laxa. Ambos melanosomas pueden estar presentes dentro de un mismo melanocito, cuando los melanosomas se especializan ya no cambian²⁷.

Los melanosomas atraviesan cuatro etapas o estadios de maduración^{21,28}, que se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Etapas de desarrollo de un melanosoma²¹

Características melanosom	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV
				
Forma	Esférico	Alargada	Elíptica, elipsoidal	Elíptica, elipsoidal
Estructura interna	-	Las fibrillas de la matriz son visibles.	Las fibrillas de la matriz son visibles.	Las fibrillas de la matriz están cubiertas por melanina polimerizada.
TYR	-	+	+	+
TYRP1	-	+	+	+
TYRP2	-	+	+	+
Síntesis de melanina	-	-	Comienza, instalarse en fibrillas internas.	Rellenado por la melanina
Color			marrón	Marrón oscuro al negro

Estadio I: en este estadio los melanosomas presentan matriz amorfa y vesículas internas que se forman como consecuencia de la invaginación de la membrana del retículo endoplasmático del cual deriva. Contienen glucoproteína Pmel17 (gp100) componente de la matriz fibrilar final.

Estadio II: los melanosomas presentan una matriz fibrilar en forma de filamentos paralelos longitudinales estructurada y organizada y la tirosinasa está presente, pero no se observa la síntesis de pigmentos.

Estadio III: los melanosomas inician la producción de melanina, que se polimeriza y se asienta en las fibrillas internas, existe una alta actividad de la tirosinasa.

Estadio IV: Los melanosomas ya están melanizados, su matriz interna queda totalmente enmascarada por los depósitos de melanina a una mínima actividad de la tirosinasa.

Una vez producida la melanina, los melanosomas se transfieren a queratinocitos vecinos donde se degradan por acción de la hidrolasa ácida lisosomal presente en los queratinocitos. Los melanosomas degradados se descartan posteriormente en el estrato córneo (etapa más superficial de la epidermis)^{20,29}.

El desarrollo de los melanosomas en los melanocitos y la capacidad de transferir y dispersar melanina proporciona principalmente las distintas tonalidades de color de piel y no la cantidad de melanocitos por unidad de área de piel³⁰.

El melanosoma durante su desarrollo adquiere tres metaloenzimas melanogénicas: la tirosinasa, la proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TRP1) y la proteína relacionada con la tirosinasa 2 (TRP2). En los mamíferos, estas tres metaloenzimas están muy relacionadas entre sí y están involucradas en el control catalítico de la melanogénesis.²⁹.

La enzima tirosinasa

La tirosinasa de mamíferos es una glicoproteína bifuncional, tiene actividad cresolasa (hidroxilando monofenoles) y catalasa (oxidando difenoles a quinonas), es dependiente del cobre y está compuesta de 529 aminoácidos con una masa molecular de 65–75 kDa luego de su glicosilación³¹.

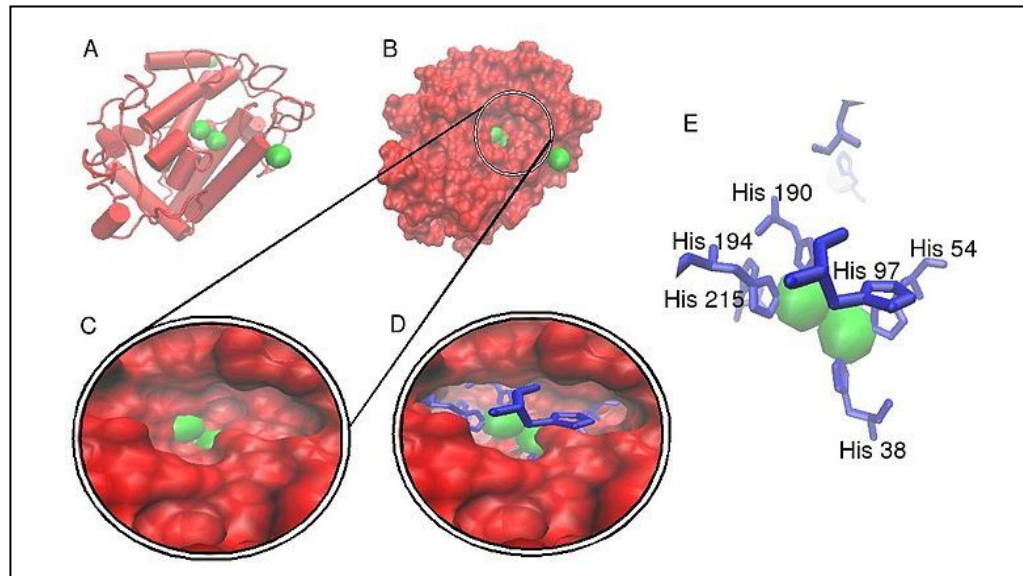


Figura 7. Enzima tirosinasa³²

La síntesis de tirosinasa se produce en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER). La tirosinasa naciente se transporta al complejo de Golgi, donde se completa la glicosilación de la tirosinasa ligada a la asparagina antes de la exportación a los melanosomas; ello es esencial para la estructura y función normal de la tirosinasa²⁹. El gen de la tirosinasa humana está en el brazo largo del cromosoma 11 (11q14) y consta de cinco exones con cuatro intrones intercalados que ocupan 117 kb de ADN en la cadena positiva³¹.

La enzima tirosinasa tiene dominios ricos en histidina (dominios ligadores de cobre A y B) por medio del cual se une a dos átomos de cobre (Cu); en cada uno de estos dominios hay tres histidinas que se encuentran en ambos lados de un dominio central rico en cisteína que interviene en la asociación con otras proteínas tal como se indica en la Figura 7.

Hacia el extremo amino hay un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (FCE) y hacia el extremo carboxilo se halla un dominio pequeño y transmembranoso, esto se puede observar en el esquema de la Figura 8³¹.

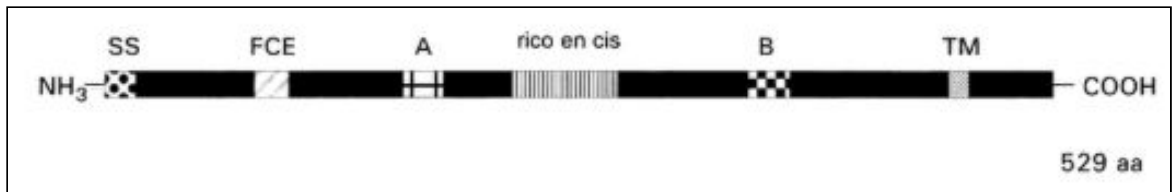


Figura 8. Esquema de la proteína tirosinasa humana³¹.

Los átomos de cobre ubicados en el sitio activo de la tirosinasa se presentan en tres estados de oxidación diferentes durante el ciclo catalítico (Figura 9): la forma deoxi [Cu(I)-Cu(I)] es una especie reducida que da lugar a la forma oxi [Cu(II) - O₂²⁻ - Cu(II)]. En la forma oxi, el oxígeno molecular se une como peróxido en una configuración que desestabiliza y activa el enlace O-O. La forma met [Cu(II)-Cu(II)] corresponde al estado de reposo de la enzima, donde los iones Cu[II] interactúan con ligandos pequeños como el agua o iones OH³³.

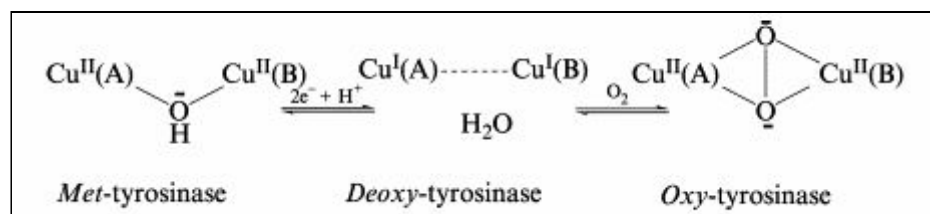


Figura 9. Estado de oxidación del cobre de la enzima tirosinasa.

Los dos átomos de cobre ubicados dentro del sitio activo de la enzima tirosinasa reaccionan con dióxígeno para formar un intermedio químico altamente reactivo que entonces oxida el sustrato³⁴ y cada cobre está coordinado con tres histidinas³⁵.

Agentes como el monóxido de carbono, cianuro, salicilaldoxamina y etiltiocarbonato, inhiben indirectamente la actividad de la tirosinasa al quelar el cobre y anular su capacidad para unirse al oxígeno²⁹.

La tirosinasa cataliza las primeras reacciones de la melanogénesis: la ortohidroxilación de monofenoles como la L-tirosina (Figura 10: Reacción 1) y la oxidación de dos electrones de o-difenoles a o-quinonas como de L-DOPA a dopaquinona (Figura 11: Reacción 2)^{26,31}.

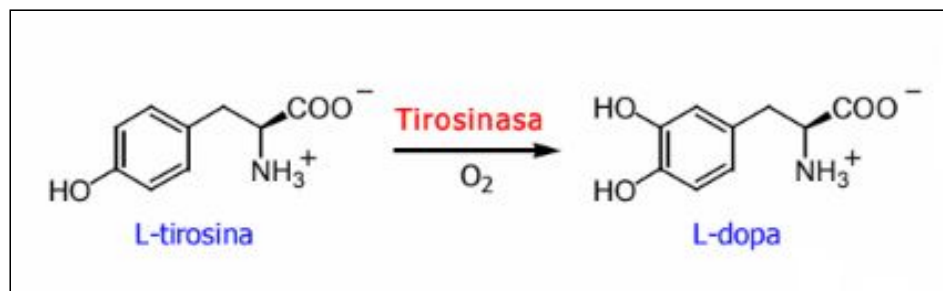


Figura 10. Reacción 1 - Oxidación de L-tirosina a L-DOPA. Oxidación de monofenoles o actividad cresolasa³⁵.

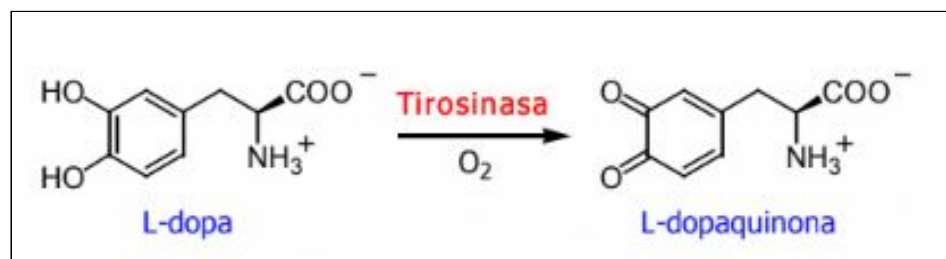


Figura 11. Reacción 2 - Oxidación de L-DOPA a Dopaquinona. Actividad catecolasa³⁵.

La estructura de tirosinasa puede ser dividida en tres dominios: el dominio central, el dominio N-terminal y el dominio C-terminal. El dominio central, que está compuesto por seis residuos de histidina, contiene los iones CuA y CuB es el dominio más conservado entre las tirosinasas^{36,37}.

Melanogénesis

La melanogénesis es la vía bioquímica responsable de la síntesis de melanina, la cual se produce en los organelos citoplásmicos, melanosomas, ubicados en los melanocitos²¹.

En el proceso de melanogénesis participan las enzimas tirosinasa, las proteínas relacionadas con la tirosinasa 1 (TRP1) y las proteínas relacionadas con la tirosinasa 2 (TRP2); estas metaloenzimas poseen un 40% de homología en su secuencia de aminoácidos, sin embargo realizan actividades diferentes y están codificadas por genes distintos²⁶.

La melanogénesis produce dos tipos principales de melanina: feomelanina y eumelanina que se diferencian en el color y en la forma de síntesis²¹. La eumelanina negra parda se sintetiza a partir del l-dopacromo y la feomelanina de color amarillo rojizo su síntesis depende de la disponibilidad de compuestos de sulfhidrilo en los melanosomas³⁸.

Etapas de la melanogénesis²⁰

- Migración de los melanoblastos desde la cresta neural hacia el tegumento del embrión.
- Diferenciación de los melanoblastos a melanocitos epidérmicos.
- Síntesis de proteínas estructurales en los melanosomas (Etapa I).
- Síntesis de la enzima tirosinasa.
- Transporte de la tirosinasa hacia los melanosomas.
- Unión de la tirosinasa a proteínas estructurales (Etapa II).
- Melanización de los melanosomas (Etapa III y IV).
- Transferencia de los melanosomas a los queratinocitos.
- Degradación de los melanosomas en el interior de los queratinocitos.
- Remoción de la melanina y melanosomas junto con la pérdida del estrato córneo.

Bioquímica de la melanogénesis

La primera etapa de la formación de melaninas es la oxidación de la tirosina a 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA) catalizada por la enzima tirosinasa. La segunda etapa es la deshidrogenación del DOPA para formar dopaquinona, esta etapa también es catalizada por la enzima tirosinasa¹³. A partir de esta etapa se inicia la

diferenciación de las melaninas y la ruta de síntesis se divide en eumelanogénesis o feomelanogénesis³⁹.

Para la ruta de la feomelanogénesis la dopaquinona reacciona con la cisteína y se produce la 5-S o 2-S cisteinildopa¹³. A partir de la cisteinildopa se sintetiza cisteinildopaquinona y dopaquinona, mediante una reacción redox con dopaquinona presente en el medio. La deshidratación y ciclación de cisteinildopaquinona produce ortoquinomina, y esta se convierte en diferentes intermediarios de bentoianina, dando lugar a la feomelanina⁴⁰.

Las rutas mencionadas se esquematizan en la Figura 12 siguiente:

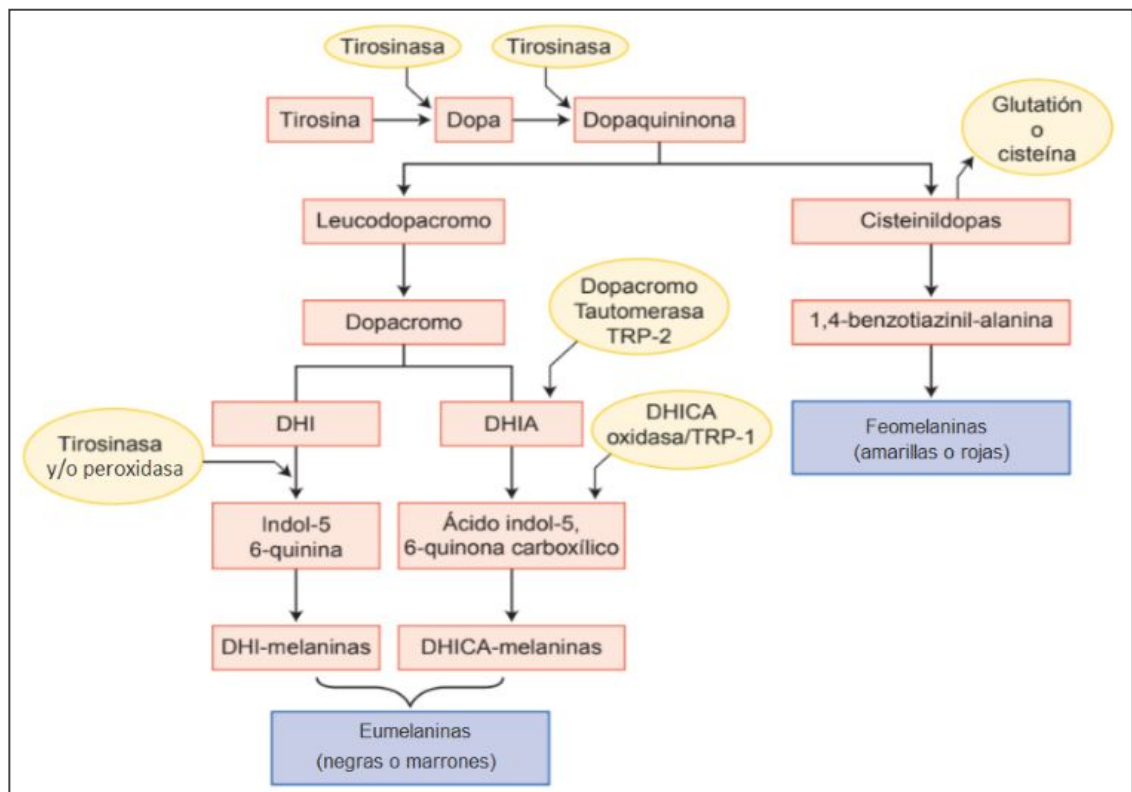


Figura 12. Bioquímica de la melanogénesis²⁶

La ruta de la eumelanogénesis parte de la dopaquinona que sufre una ciclación espontánea a dopacromo, este pierde un ácido carboxílico y genera 5,6-dihidroxiindol (DHI) que se oxida y polimeriza a DHI-melanina. Pero si se encuentra presente la dopacromo tautomerasa y la TRP2, el dopacromo entonces

formará DHI-2-ácido carboxílico (DHICA), y en presencia de la enzima DHICA-oxidasa y TRP1 forman el ácido indol-5, 6 quinona carboxílico; para luego terminar en DHICA melanina⁴⁰.

La eumelanogénesis requiere de estas tres enzimas además de la tirosinasa: la proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TRP1), la proteína relacionada con la tirosinasa 2 (TRP2) y la dopacromo tautomerasa (DCT). Mientras que la vía de síntesis de la feomelanogénesis requiere de la adición de derivados de azufre²⁶.

Las funciones de los pigmentos melánicos abarcan; la fotosíntesis de vitamina D3, la regulación de temperatura y la protección contra mutación celular ocasionada por rayos UV. Por ejemplo, en pieles bien pigmentadas donde el factor de protección de la melanina es de 1,6 a 2,0 es posible que la melanina absorba hasta la mitad de toda la radiación que incide en dicha piel⁴¹.

Regulación de la melanogénesis

Diversos factores externos e internos así como acciones hormonales, autocrinas y paracrinas interactúan con mecanismos de receptores en la membrana del melanocito para efectuar una compleja regulación de la melanogénesis⁴¹. Los factores principales de regulación de la melanogénesis son: la radiación ultravioleta, la acción de los fibroblastos, los factores de crecimiento, la intervención de la luz visible y el sistema inmunitario. Dichos estímulos inducen cambios en la cantidad y calidad de pigmento sintetizado, en el número de melanosomas, la dendricidad melanocítica y el paso de los melanosomas a los queratinocitos vecinos²⁶.

Pigmentación natural de la piel

El pigmento que determina el color de la piel es la melanina. A pesar de que la cantidad de melanocitos es indistinta en todas las personas, existen diferencias de número, tamaño, forma, distribución y degradación de los melanosomas entre distintas razas y etnias. Asimismo, se cree que la melanina se encuentra dispersa

en el queratinocito y su citoplasma^{20,42,43} y por lo tanto se considera que la pigmentación cutánea constitutiva o basal depende del nivel de actividad melanogénica y de la transferencia de melanina a los queratinocitos vecinos²⁵.

El fototipo cutáneo de las personas es el resultado de la combinación de melanina constitutiva e inducida.

Clasificación de fototipos según Fitzpatrick

En 1975 Dr. Fitzpatrick y sus colegas establecieron la clasificación de fototipos de la Tabla 2 considerando que no existe diferencias significativas en el número de melanocitos de la piel, esta clasificación se basa en las características fenotípicas, la sensibilidad y tolerancia de la piel a la radiación ultravioleta⁴⁴.

Tabla 2. Clasificación de fototipos según Fitzpatrick⁴²

Fototipo	Descripción del Fototipo de piel	Reacción de la piel a la exposición UV	Color constitutivo (áreas no expuestas al sol)
I	Cabello pelirrojo, rubio. Ojos azules, verdes. Piel muy clara.	Se quema fácilmente. Nunca se broncea.	Blanco marfil
II	Cabello de color intermedio. Ojos claros a intermedios. Piel clara a intermedia.	Se quema fácilmente. Se broncea con dificultad.	Blanco
III	Cabello de color intermedio. Ojos intermedios a oscuros. Piel intermedia a oliva.	Se quema moderadamente. Bronceado moderado y uniforme	Blanco
IV	Cabello oscuro. Ojos oscuros. Piel oliva oscura a moreno claro.	Mínima quemadura. Se broncea moderada y fácilmente	Beige, ligeramente bronceado
V	Cabello oscuro. Ojos oscuros. Piel morena.	Rara vez se quema. Se broncea profusamente.	Bronceado
VI	Cabello oscuro. Ojos oscuros. Piel muy oscura.	Nunca se quema. Piel bronceada naturalmente.	Café oscuro, negro

4.3.3. Alteraciones de la pigmentación de la piel

Las alteraciones que cursan con cambios del color natural de la piel se denominan discromías. Las diferentes alteraciones de la pigmentación se clasifican según criterios etiológicos (alteraciones genéticas o adquiridas), clínicos (alteraciones circunscritas o difusas) o patogénicos^{45,46}.

Considerando que la melanina sea la principal responsable de la alteración en la pigmentación, tenemos dos tipos principales de alteraciones pigmentarias: melánicas o no melánicas según la tabla 3. Las distintas enfermedades que producen estas alteraciones se distinguen por el momento de aparición, la localización, la extensión y la presencia o no de síntomas acompañantes⁴⁷.

Las alteraciones melánicas de la piel se clasifican en⁴³:

Hipermelanosis: es el aumento de melanina en la epidermis esto puede deberse a tres factores; genéticos, hormonales y radiación ultravioleta.

Hipomelanosis: es la disminución de melanina en la epidermis esto se debe a procesos genéticos, autoinmunitarios o inflamatorios.

Tabla 3. Clasificación de las alteraciones de la pigmentación de la piel⁴⁶

Melánicas		
Hipomelanosis	Melanopénicas (disminución de la producción de melanina)	Albinismos Fenilcetonuria Esclerosis tuberosa Hipomelanosis de Ito Hipomelanosis guttata idiopática Hipopigmentaciones post-inflamatorias Nevus despigmentado
	Melanocitopénicas (disminución del número o falta de melanocitos)	Vitíligo Síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada Piebaldismo Nevus de Sutton

Hipermelanosis	Melanica (Incremento de la producción de melanina únicamente, sin incremento de los melanocitos)	Manchas café con leche Melasma Síndrome de Peutz-Jeghers Enfermedad de Addison Síndrome de Cushing Embarazo Porfirias Síndrome de Cronkhite-Canadá Hiperpigmentaciones postinflamatorias Hiperpigmentación por fármacos Incontinentia pigmenti Amiloidosis macular Hemocromatosis
	Melanocítica (aumento del número de melanocitos que produce más concentraciones de melanina)	Lentigo simple y lentiginosis Complejo de Carney Síndrome de LEOPARD Mancha mongólica Nevus de Ito Nevus de Ota
No melánicas		
Tatuajes Metales pesados Fármacos Carotenodermia		

Hipopigmentación

Se ocasiona por disminución de síntesis de melanina, bien por toda la superficie corporal o localizada en alguna parte concreta. Cuando la piel no sintetiza melanina es incapaz de defenderse de las agresiones del sol y radiación UV. Las causas más comunes son: hereditarias, genéticas, por toma o aplicación de medicamentos, quemaduras, infecciones (víricas, por hongos, etc.) aunque también se origina por causas desconocidas. La hipomelanosis más frecuente y extendida es el vitiligo⁴⁸.

Vitiligo: se caracteriza clínicamente por manchas blancas con bordes convexos de 5 mm a 5 cm y van apareciendo y creciendo gradualmente hasta afectar a toda la piel, se debe a la pérdida de melanocitos epidérmicos y ataca al 1% en la población general⁴⁹.

Hiperpigmentación

La hiperpigmentación se debe a un incremento en la síntesis de melanina, en el número de melanocitos, o pueden ser secundarias debido a procesos inflamatorios⁵⁰. La coloración de la piel también puede deberse a sustancias exógenas, es decir ésta puede ser pigmentación congénita o pigmentación adquirida⁵¹.

Dentro de las hiperpigmentaciones epidérmicas se deben diferenciar aquellas que se dan por el aumento de melanocitos y aquellas que se dan por el aumento de melanina, algunas de ellas son las siguientes⁵²:

A) Hiperpigmentación por aumento de melanina

Melasma: es un desorden pigmentario adquirido común, caracterizado por la presencia de manchas hiperpigmentadas irregulares, localizadas en zonas fotoexpuestas, como resultado de un incremento de la melanina epidérmica y/o dérmica⁵⁰.

Hiperpigmentación postinflamatoria: la hiperpigmentación postinflamatoria (HPI) es un trastorno causado por numerosas agresiones cutáneas precedentes, como reacciones medicamentosas y fototóxicas, infecciones, lesión física o traumatismo, reacciones alérgicas y enfermedades inflamatorias. La HPI consiste en la hiperpigmentación macular en el sitio de inflamación²⁷.

Eférides o pecas: son pequeñas manchas marrón claro, que aparecen en las partes de la piel expuestas al sol en individuos de piel clara. El examen histopatológico evidencia una cantidad normal de melanocitos pero un incremento de producción de melanina en la capa basal de la epidermis²⁷.

Nevus de Becker: es un hamartoma cutáneo caracterizado por un parche unilateral, se presenta como una mácula hiperpigmentada de bordes geográficos con diversos grados de hipertrichosis, con localizaciones habituales en hombros o tórax⁵³.

B) Hiperpigmentación por aumento de melanocitos

Lentigo (juvenil): se presenta en cualquier zona de la piel a partir de los 3 años como manchas marrón o pardo-oscuros de 1-5 mm. Presenta un aumento de la cantidad de melanocitos con hiperplasia⁴⁹.

Lentigo senil o actínico: se presenta como una lesión de mayor diámetro que el lentigo juvenil con tonalidad marronácea y superficie rugosa y descamativa⁴⁹.

4.3.4. Sustancias despigmentantes de la piel

Existen diversas sustancias usadas como despigmentantes y según su mecanismo de acción se clasifican en:

A. Inhibidores de la tirosinasa

Hidroquinona: es un compuesto hidroxifenólico que impide la conversión de dihidroxifenilalanina a melanina por inhibición de la enzima tirosinasa. En presentaciones de venta libre se presenta en concentraciones no mayores al 2%. Es un agente eficaz en caso de melasma, lentigos, pecas e hiperpigmentación postinflamatoria⁴².

Ácido kójico: esta sustancia inhibe la tirosinasa mediante quelación de su ión cobre. Este compuesto se obtiene por fermentación con especies micóticas del *Aspergillus*, *Acetobacter* y *Penicillium*. En formulaciones se recomienda de 2 a 4% de concentración para lograr eficacia. Posee un amplio rango de pH⁵⁴.

Arbutina: es un derivado de la hidroquinona, inhibe competitivamente a la tirosinasa e induce una reducción dosis-dependiente de la actividad de la tirosinasa y del contenido de melanina. Para lograr eficacia es necesario una concentración del 3%⁴².

B. Inhibidores de la producción de melanina

Glutation: poseen un grupo SH reductor que interacciona con el cobre de la tirosinasa; también son capaces de reducir la dopaquinona a dopa⁵⁴.

Ácido Ascórbico: puede inactivar la tirosinasa y es capaz de reducir la dopaquinona hasta dopa. Se emplea a dosis del 2-3 %⁵⁴. Es muy inestable, ya que rápidamente se oxida y se descompone fácilmente en solución acuosa⁵⁵.

C. Inhibidores no selectivos de la melanogénesis

Corticosteorides: esta inhibición resulta de la acción antiinflamatoria, ya que inhiben la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, disminuye el recambio epidérmico por acción citostática y en formulaciones combinadas contribuyen a la disminución de la irritación que producen otros agentes despigmentantes⁵⁶.

D. Inductores de toxicidad selectiva del melanocito

Elementos mercuriales: como mercurio amoniacal; inactivan la tirosinasa por interacción con el cobre. Actualmente está prohibido en formulaciones cosméticas ya que presenta efectos tóxicos⁵⁷.

E. Agentes que favorecen la penetración de los despigmentantes

Ácido Retinoico: inhibe el factor de conversión de la tirosinasa y dopacromo sin causar toxicidad al melanocito interfiriendo además con la transferencia de melanosomas a los queratinocitos⁵⁷.

4.4. Efecto anti-tirosinasa

4.4.1. Enzimas e inhibidores enzimáticos

“Las enzimas son moléculas proteicas de alto peso molecular que actúan como catalizadores en reacciones químicas del metabolismo, poseen un grado de especificidad elevado respecto a sus sustratos; disminuyen la energía de activación necesaria para que se inicie una reacción metabólica, sin ellas las reacciones metabólicas sucederían muy lentamente”⁵⁸.

Estructura de las enzimas

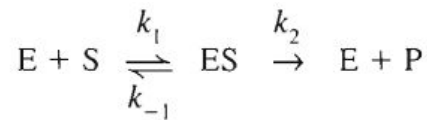
Las enzimas presentan una conformación tridimensional con un centro activo que interactúa con las moléculas del sustrato (ligando) mediante un acoplamiento espacial y químico (grupos funcionales de la enzima y el sustrato establecen diferentes tipos de interacciones débiles entre sí). El centro activo de la enzima es responsable de su especificidad y la acción catalizadora debido a que interiormente está bordeada por una serie de restos de aminoácidos⁵⁹.

Cinética enzimática

La cinética enzimática estudia la unión de las enzimas a sus sustratos y la transformación en productos, así se conoce la velocidad de la reacción y su afinidad a sustratos e inhibidores; se establecen la velocidad catalítica máxima de dichas reacciones. Observando la variación de velocidad de una reacción y al combinar esta información con los estudios químicos y estructurales de una enzima; se deduce el mecanismo catalítico de la enzima⁶⁰.

“La cinética enzimática propone como primera reacción (k_1) que la enzima (E) se combina con el sustrato (S) de forma reversible, formando el complejo enzima-sustrato (ES), y que en una segunda reacción el complejo enzima sustrato se descompone dejando libre a la enzima (E) y al producto (P). La velocidad de la segunda reacción (k_2) es baja, y el modelo de Michaelis-Menten supone que la

probabilidad de que la enzima reaccione con el producto para volver a formar ES, es tan ínfima que resulta despreciable”⁵⁹.



Donde: $k_1 \rightarrow$ Constante de velocidad de la formación de la ES.

$k_{-1} \rightarrow$ Constante de velocidad de la disociación de la ES.

$k_2 \rightarrow$ Constante de velocidad de la formación del producto.

“El método de Michaelis-Menten relaciona la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima con la concentración del sustrato; existiendo dos constantes en esta ecuación: v_{max} y K_m que son únicas para cada enzima en condiciones de temperatura y pH a una concentración dada de la enzima⁶¹. Ecuación de Michaelis-Menten”:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Donde:} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

“Cuando la velocidad (v_0) es la mitad de la velocidad máxima ($v=V_{m\acute{a}x}/2$), se obtiene una equivalencia de la concentración de sustrato a la constante de Michaelis ($[S]=K_m$), lo que representa una medida más sencilla de determinar que la relación de constantes de equilibrio, y permite expresar este parámetro cinético en unidades de concentración”⁶².

Factores que afectan la actividad enzimática

La actividad de las enzimas se modifica conforme a ciertos factores como:

Temperatura: “Afecta todas las reacciones del organismo, ya que a mayor temperatura las moléculas presentan energía suficiente para entrar al estado de transición, la velocidad de reacción y el número de colisiones también se aumenta. El número de colisiones también ocasiona un aumento de la temperatura”⁶³. Cabe resaltar que las enzimas son proteínas y se desnaturalizan por encima de los 50°C disminuyendo su actividad⁶⁴.

pH: “El pH en el cual una enzima tiene actividad óptima se ve graficada como una curva acampanada en el cual ambos extremos se ve reducida su velocidad catalítica. El pH determina la carga de los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la enzima”⁶⁴. “La carga neta de la enzima influye en la unión del sustrato y la actividad catalítica. Si un sustrato contiene un grupo ionizable, el cambio de pH puede alterar su capacidad para unirse al sitio activo. Los cambios en los grupos ionizables pueden alterar la estructura terciaria de la enzima provocando su desnaturalización”⁶³.

Inhibidores enzimáticos: pueden ser reversibles o irreversibles.

- **Inhibición reversible:** según el lugar y forma de unión a la enzima se clasifica en competitiva y no competitiva (Figura 13).

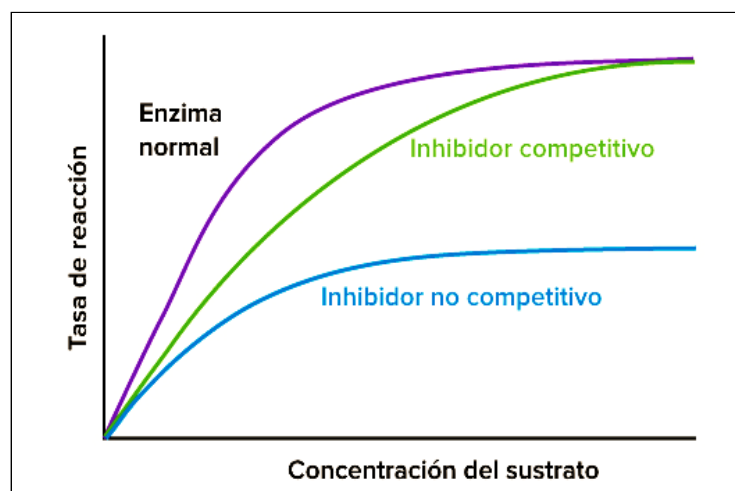


Figura 13. Inhibición enzimática competitiva y no competitiva⁶⁵.

- o **Inhibición competitiva:** el inhibidor tiene una estructura semejante al sustrato y este se une a la enzima en su sitio activo, de forma que desplazan al sustrato reversiblemente en la enzima debido a la ley de acción de masas⁵⁸.
- o **Inhibición no competitiva:** se debe a que el inhibidor y el sustrato pueden estar unidos a la enzima al mismo tiempo. El inhibidor se adhiere a otro sitio de la enzima y evita que la enzima realice su función.

Esta inhibición puede ser contrarrestada mediante diálisis de la enzima inhibida siempre y cuando el inhibidor no haya reaccionado covalentemente con la enzima⁵⁸.

- **Inhibición irreversible:** cuando los inhibidores se unen a la enzima a cualquier parte de ella mediante enlaces covalentes, lo hacen de forma irreversible⁵⁸.

4.4.2. Productos naturales inhibidores de la enzima tirosinasa

Los flavonoides (kaempferol, quercetin, kurarinona y kushnol) aislados de diversas plantas también inhiben la tirosinasa mediante quelación del cobre . Estudios han establecido que los flavonoides con grupo α -ceto potencian dicha actividad inhibidora debido a la similitud de sus grupos dihidroxifenilos a los de L-DOPA. Otros polifenoles importantes como el ácido gálico y sus ésteres inhiben la oxidación de la L-DOPA catalizada por la tirosinasa. El ácido gálico parece actuar como inhibidor competitivo de L-DOPA⁶⁶.

Los aldehídos como el transcinamaldehído, el ácido 3,4-dihidroxicinámico, los (2E)-alquenes, el anisaldehído, el cuminaldehído, el ácido cúmico, el ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico y el 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído inhiben a la enzima tirosinasa. La inhibición se debe a la formación de una base de Schiff con un grupo amino primario de la enzima tirosinasa⁶⁶.

5. METODOLOGÍA

5.1. Tipo de investigación

La presente investigación es experimental y prospectiva.

5.2. Materiales, equipos y reactivos

5.2.1. Material botánico

- Muestra vegetal del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja)

5.2.2. Materiales de laboratorio

- Rayador
- Espátulas
- Placas petri
- Probetas graduadas
- Vasos de precipitado
- Embudos
- Soxhlet
- Papel filtro
- Frascos ambar de vidrio
- Tubos de plástico 10 mL y eppendorf 2 mL
- Pipetas
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Fiolas
- Tubos de vidrio
- Gradillas
- Placas de silicagel
- Cámara cromatográfica
- Aspersor

- Termómetro ambiental
- Cubetas para espectrofotometría
- Microplacas de 96 pocillos

5.2.3. Equipos

- Balanza analítica METTLER (Precisión 0,001 g)
- Balanza analítica METTLER (Precisión 0,00001 g)
- Estufa de secado
- Equipo evaporador rotatorio BÜCHI
- pHmetro portátil HANNA
- Lámpara UV
- Espectrofotómetro
- Lector de Microplacas BIOBASE

5.2.4. Reactivos

- Éter de petróleo
- Metanol
- Acetato de Etilo
- Agua destilada
- Monofosfato de sodio
- Bifosfato de sodio
- DMSO
- Reactivos para marcha fitoquímica
- Ácido Clorhídrico
- Ácido Kójico
- L-Tirosina
- Tirosinasa

Los reactivos fueron de grado analítico de las casas Sigma, Sigma-Aldrich, Merck y J.T.Baker (Anexo 3).

5.3. Colecta del material botánico

Los frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) se colectaron en la provincia de Huaral, departamento de Lima entre septiembre de 2018 y febrero de 2019.

5.4. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la especie se certificó según el Sistema Integrado de Clasificación Angiospermas de Arthur Cronquist mostrado en los Anexos 1 y 2.

5.5. Tratamiento de la muestra y preparación de extractos

- Se realizó la limpieza de 80 frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) con agua fresca y se extrajo el epicarpio de cada fruto con un rallador. Luego se pesó la muestra obtenida.
- Se eliminó la humedad de la muestra a temperatura de 38-42 °C, durante 48 horas hasta alcanzar la sequedad (peso constante).
- La muestra seca del epicarpio de la naranja fue pulverizada. El polvo obtenido se pesó, se empacó en papel aluminio y en bolsa de polietileno sellado herméticamente y se almacenó en congelación hasta su uso.
- Se colocó individualmente ocho cartuchos (conteniendo cada cartucho cinco gramos de la muestra en polvo) dentro de un sistema de soxhlet para la eliminación de lípidos y pigmentos excedentes mediante reflujo con 200 mL de éter de petróleo durante seis horas aprox. para cada cartucho.
- Los residuos de cuatro cartuchos secos fueron macerados con 400 mL de solvente metanol al 70% y los residuos de otros cuatro cartuchos fueron macerados con 400 mL de acetato de etilo, se agitaron los frascos cada 12 horas durante 48 horas.
- Se filtró cada macerado y se concentró las muestras con evaporador rotatorio, los extractos concentrados fueron trasvasados a beakers rotulados previamente tarados y finalmente se evaporó en estufa de secado durante 24 horas. (Anexo 4)

5.6. Identificación de componentes de los extractos del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja): tamizaje fitoquímico

- Se realizaron pruebas químicas para la identificación de los principales grupos de metabolitos presentes en los extractos metanólico y etil acetato, siguiendo la metodología de Sharapin⁶⁷.
- Se prepararon soluciones de los extractos al 2 % en DMSO para el desarrollo de las pruebas indicadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Pruebas de identificación fitoquímica.

Ensayo de identificación	Procedimiento	Indicador positivo
Identificación de Alcaloides: Ensayo de Dragendorff Ensayo de Mayer	1 mL de extracto + 3 gotas de Rvo. Dragendorff 1 mL de extracto + 1 gota de HCl concentrado + calentamiento + NaCl /agitación y filtrado + 3 gotas de Rvo. de Mayer	Dragendorff: Precipitado rojizo Mayer: Precipitado blanquecino
Identificación de Quinonas: Ensayo de Bornträger	1 mL de extracto + 1 mL de Rvo. Bornträger + agitación	Coloración anaranjado-rojiza
Identificación de Compuestos reductores: Ensayo de Fehling	2 mL de Rvo. de Fehling A + 2 mL de Fehling B + calentamiento/ebullición por 1 minuto + 1 mL de extracto / ebullición por 1 minuto	Precipitado color ladrillo
Identificación de Saponinas: Ensayo de Espuma	1 mL de extracto + 2 mL de agua + agitación por 30 segundos	Espuma por 20 min. Aprox.
Identificación de Flavonoides: Ensayo de Shinoda	2 mL de extracto + Mg metálico + HCl concentrado	Coloración amarillo a rojizo
Identificación de Polifenoles: Ensayo de Cloruro Férrico	2 mL de extracto + 1 mL de agua + 3 gotas de FeCl ₃ al 1%	Color azul (P. gálicos) Color verde (P. catéquicos)

5.7. Determinación del efecto anti-tirosinasa de los extractos del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja)

Se realizó una determinación cualitativa del efecto anti-tirosinasa mediante la observación de una decoloración sobre un fondo gris en un placa cromatográfica siguiendo la metodología de Wangthong *et al.*⁶⁸ con ligeras modificaciones.

- **Preparación de Fase Móvil:** se saturó la cámara cromatográfica con 60 mL de la mezcla metanol: acetato de etilo (60:40).
- **Preparación de Fase Estacionaria:** se activó dos placas de sílica gel de 15 cm x 10 cm.
- **Preparación de soluciones:** se preparó soluciones de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) en DMSO al 2 % (equivale a 20 mg/mL), solución de estándar ácido kójico al 0,05 % (equivale a 0,5 mg/mL) en buffer fosfato 0,1 M (pH 6,8), solución de L-tirosina 1 mM en buffer y solución de enzima tirosinasa 1000 U/mL en buffer, esta última fue congelada hasta el momento de su uso.
- **Siembra de la muestra:** se depositó 100 μ L de las soluciones de los dos extractos y del estándar, por triplicado cada uno, en el fondo de la placa de sílica gel (aproximadamente un centímetro desde el borde inferior) en el orden indicado en la Figura 14.

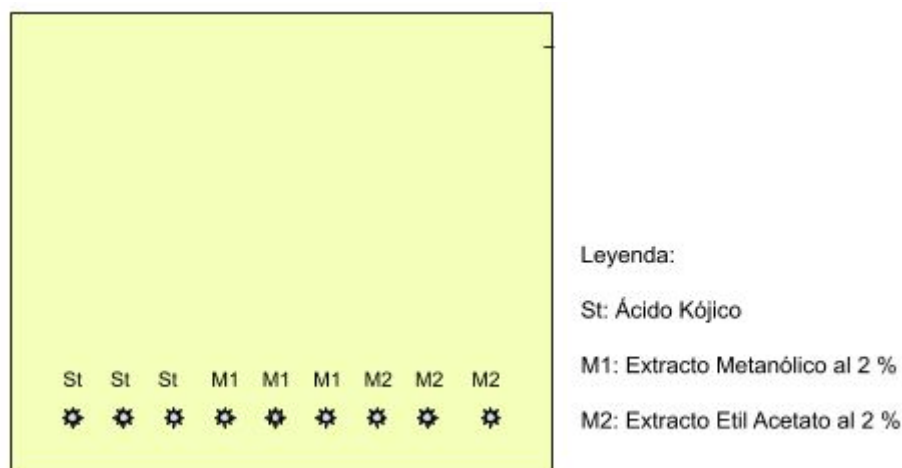


Figura 14. Ubicación de las muestras en placa cromatográfica.

- **Desarrollo cromatográfico:** se dejó secar durante cinco minutos a temperatura ambiente, se colocó dentro de la cámara cromatográfica y se dejó eluir hasta un centímetro previo al borde superior de la placa. Al término de ascender la fase móvil se retiró la placa del interior de la cámara cromatográfica y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Las manchas separadas en la fase estacionaria se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta a 365 nm.
- **Visualización del efecto inhibitorio de los extractos:** la cantidad de 2,5 mL de solución de enzima L-tirosinasa fue pre-incubada durante cinco minutos a temperatura ambiente para su uso. Se procedió a aspersar 2,5 mL de solución tirosinasa sobre toda la placa e inmediatamente se aspersó la misma cantidad de solución L-tirosina sobre la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente. La inhibición de la tirosinasa se observó como la aparición de zonas incoloras sobre un fondo gris-violeta.

5.8. Comparación del efecto anti-tirosinasa de los extractos del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) con el obtenido por ácido kójico.

Se realizó la comparación de los efectos anti-tirosinasa de los extractos obtenidos versus el efecto obtenido mediante estándar de ácido kójico, según lo indicado en la metodología de Vardhan⁶⁹ con ligeras modificaciones.

El valor de comparación se estableció como el porcentaje de inhibición (%I), hallado mediante la ecuación siguiente, absorbancias de dopacromo obtenidas a 492 nm. Este porcentaje se calcula en función de la absorbancia, en ausencia y presencia de la solución inhibidora.

$$\% \text{ de Inhibición de la tirosinasa} = \frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} \times 100$$

Donde: **A** = absorbancia de la solución en blanco con enzima
B = absorbancia de la solución en blanco sin enzima
C = absorbancia de la solución de muestra con enzima
D = absorbancia de la solución de muestra sin enzima
A-B = Parámetro sin inhibidor
C-D = Parámetro con inhibidor

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Buffer fosfato 0,1M pH 6,8:** se pesó 4,9943 g de Na_2HPO_4 y 9,9635 g de NaH_2PO_4 y se disolvió en un litro de agua destilada. Se midió el pH con potenciómetro a 25°C.
- **Solución de L-Tirosina 0,1 M:** se pesó 25 mg de tirosina, se disolvió en 1 mL de HCl 1 M y se completó con buffer fosfato 0,1M pH 6,8 en fiola de 10 mL. Se retiró una alícuota de 3626 μL de la solución previa hacia fiola de 50 mL y se completó con buffer. Se almacenó protegido de la luz en lugar fresco y seco.
- **Solución de Tirosinasa 1000 U/mL:** se pesó 3,72 mg de enzima tirosinasa 2687 U/mg y se completó con buffer fosfato 0,1M pH 6,8 en fiola de 10 mL. La solución se trasvasó a recipiente plástico y fue almacenada en congelación hasta el momento de su uso.
- **Soluciones de Ácido kójico:** se pesó 25 mg de ácido kójico estándar y se completó con buffer fosfato 0,1M pH 6,8 en fiola de 50 mL (solución madre de ácido kójico 0,5 mg/mL \leftrightarrow 0,05%). A partir de la solución madre se prepararon diluciones; 0,3 mg/mL \leftrightarrow 0,03%; 0,1 mg/mL \leftrightarrow 0,01%; 0,05 mg/mL \leftrightarrow 0,005%, 0,03 mg/mL \leftrightarrow 0,003% y 0,01 mg/mL \leftrightarrow 0,001%.
- **Soluciones de extracto metanólico del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja):** se pesó 60 mg de extracto metanólico seco y se disolvió en 3 mL de DMSO (solución de extracto al 2 % \leftrightarrow 20 mg/mL). A partir de dicha solución se prepararon las siguientes diluciones: 12,5 mg/mL \leftrightarrow 1,25 %; 5 mg/mL \leftrightarrow 0,5% y 1,5 mg/mL \leftrightarrow 0,15 %.
- **Soluciones de extracto etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja):** se pesó 60 mg de extracto etil acetato seco y se disolvió en 3 mL de DMSO (solución de extracto al 2 % \leftrightarrow 20 mg/mL). A partir de

dicha solución se prepararon las siguientes diluciones: 5 mg/mL \leftrightarrow 0,5 %; 2,5 mg/mL \leftrightarrow 0,25%; 1,25 mg/mL \leftrightarrow 0,125 % y 0,75 mg/mL \leftrightarrow 0,075 %.

Se verificó la actividad enzimática de la solución de enzima tirosinasa preparada en función del tiempo mediante medición de absorbancia en espectrofotómetro a 492 nm y se observó la aparición de la coloración característica del complejo dopacromo. Las cantidades de reactivos usados se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Preparación de cubetas para verificación espectrofotométrica.

	Complejo	Blanco
Enzima (tirosinasa)	100 μ L	-
Buffer	600 μ L	700 μ L
Pre- incubación	Se pre-incubó las soluciones a 25°C durante 20 minutos.	
Sustrato (L-tirosina)	100 μ L	100 μ L
Incubación	Se incubó las soluciones a 25°C hasta aparición de coloración.	

Se obtuvo el tiempo de incubación requerido (45 minutos) para la actividad máxima de conversión a dopacromo.

Luego se preparó una batería de muestras en microplaca de 96 pocillos según lo indicado en la Tabla 6 de la siguiente página, donde todas las muestras fueron preparadas por triplicado.

Se realizó lectura de los pocillos en el equipo Lector de microplacas a longitud de onda 492 nm, para lo que se tomó en cuenta el blanqueamiento previo de la microplaca vacía.

Los datos obtenidos fueron procesados con los programas SPSS (V.25) y Excel 2013.

Tabla 6. Preparación de la microplaca para el ensayo espectrofotométrico.

	A	B	X ₁	Y ₁	X ₂	Y ₂	X ₃	Y ₃
Enzima (Tirosinasa)	20 μL	-	20 μL	-	20 μL	-	20 μL	-
Buffer	120 μL	140 μL	20 μL	40 μL	20 μL	40 μL	20 μL	40 μL
Extracto metanólico	-	-	100 μL	100 μL	-	-	-	-
Extracto etil acetato	-	-	-	-	100 μL	100 μL	-	-
Estándar de ácido kójico	-	-	-	-	-	-	100 μL	100 μL
Pre-incubación	Se pre-incubó las soluciones a 25°C durante 20 minutos.							
Sustrato (L-Tirosina)	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL
Incubación	Se incubó las soluciones a 25°C durante 45 minutos.							

Donde los microtubos:

A: Es el blanco con enzima (letra A en la fórmula)

B: Es el blanco sin enzima (letra B en la fórmula).

X₁: Es la muestra metanólica con enzima (letra C en la fórmula).

Y₁: Es la muestra metanólica sin enzima (letra D en la fórmula).

X₂: Es la muestra de etil acetato con enzima (letra C en la fórmula).

Y₂: Es la muestra de etil acetato sin enzima (letra D en la fórmula).

X₃: Es el estándar de ácido kójico con enzima.

Y₃: Es el estándar de ácido kójico sin enzima.

X₁ y Y₁ son muestras de extracto metanólico y se prepararon por triplicado en cuatro distintas concentraciones de estudio; tales como: 20 mg/mL; 12,5 mg/mL; 5 mg/mL y 1,5 mg/mL.

X₂ y Y₂ son muestras de extracto etil acetato y se prepararon por triplicado en cuatro distintas concentraciones de estudio; tales como: 5 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL y 0,75 mg/mL.

X₃ y Y₃ son soluciones de estándar ácido kójico y se prepararon por triplicado a distintas concentraciones de estudio; tales como: 0,5 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,03 mg/mL y 0,01 mg/mL.

5.9. Análisis estadístico

Se usó el estadístico descriptivo chi cuadrado para el análisis de la relación asociativa entre las variables (extractos del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja), ácido kójico y blanco) y su efecto anti-tirosinasa visible en capa fina.

Los resultados con valores cuantitativos fueron expresados en promedios de las mediciones obtenidas y se usó el método estadístico ANOVA para el análisis de datos de distribución normal con significación de 5% ($p=0,05$) para rechazar la hipótesis nula (No existe relación entre solución usada y efecto anti-tirosinasa). Se usó análisis Post Hoc DMS ejecutado en el programa SPSS (Versión 25) para comparar medias de porcentajes de inhibición intragrupos.

6. RESULTADOS

6.1. Rendimiento de la extracción

En la siguiente tabla se detalla el porcentaje de rendimiento durante la preparación de los extractos respecto de la muestra seca, asimismo se indica el peso total de la muestra de epicarpio de 80 frutos recién rallados previo al secado.

Tabla 7. Porcentaje de rendimiento de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) a partir de muestra seca.

	Peso de muestra	Peso de muestra seca	Peso de extracto	Rendimiento
Extracto metanólico (EM)	720,0 g	163,3 g	43,8 g	26,8 %
Extracto Etil Acetato (EEA)	720,0 g	163,3 g	1,2 g	0,7 %

6.2. Composición fitoquímica de los extractos de epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja)

Los extractos de cáscara de naranja obtenidos mostraron la presencia de algunos tipos de metabolitos en tamizaje fitoquímico (Anexo 5) según lo señalado en la tabla 8.

Tabla 8. Identificación fitoquímica de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja).

Ensayo de identificación	Metabolito	RESULTADO	
		Extracto metanólico (EM) al 2 %	Extracto Etil Acetato (EEA) al 2 %
Dragendorff	Alcaloides	++	+
Mayer	Alcaloides	+	+
Bornträger	Quinonas	++	+++
Fehling	Compuestos reductores	+++	-
Espuma	Saponinas	-	-
Shinoda	Flavonoides	++	+
Cloruro Férrico	Polifenoles	+++ (*)	++ (**)

Leyenda:

- (+++) Presencia en mayor cantidad del metabolito en el extracto.
- (++) Presencia en mediana cantidad del metabolito en el extracto.
- (+) Presencia en poca cantidad del metabolito en el extracto.
- (-) Ausencia del metabolito en el extracto.
- (*) Coloración azul-verdosa
- (**) Coloración verde

6.3. Efecto anti-tirosinasa de los extractos del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja)

6.3.1. Método cualitativo

El efecto anti-tirosinasa se determinó mediante dos corridas cromatográficas y tres repeticiones por cada solución de trabajo (Anexo 6), los resultados se muestran en la Tabla 9. El recuento estadístico de resultados mediante tablas cruzadas se muestra en la Tabla 10.

Tabla 9. Efecto anti-tirosinasa de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) al 2 %.

Solución	RESULTADO	
Ácido kójico	P	P
	P	P
	P	P
Extracto metanólico (EM)	P	P
	P	P
	P	P
Extracto Etil Acetato (EEA)	P	P
	P	P
	P	P
Blanco	N	N

Leyenda:

P = Positivo. Decoloración sobre fondo pardo-violeta.

N = Negativo. Coloración pardo-violeta.

Tabla 10. Recuento de resultados en tabla cruzada de Muestras vs Resultados (Efecto anti-tirosinasa) de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) 2 %.

Tabla cruzada Solución muestra*Decoloración				
Recuento				
		Decoloración		Total
		P	N	
Solución muestra	EM	6	0	6
	EEA	6	0	6
	AK	6	0	6
	Blanco	0	2	2
Total		18	2	20

Leyenda:

AK = Ácido kójico

EM = Extracto metanólico del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja)

EEA = Extracto Etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja)

P = Decoloración positiva.

N = Decoloración negativa.

Tabla 11. Estadístico descriptivo chi cuadrado con significación asintótica bilateral 0,00 (menor a 0,05 para intervalo de confianza de 95%).

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	20,000 ^a	3	,000
Razón de verosimilitud	13,003	3	,005
Asociación lineal por lineal	7,125	1	,008
N de casos válidos	20		
a. 5 casillas (62,5%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,20.			

La significación asintótica de los datos ingresados resultó 0,00 (<0,05 para un intervalo de confianza de 95%) conforme a lo indicado en la Tabla 11, lo que rechazó la hipótesis de independencia entre las variables (Anexo 8). Este hallazgo afirma la relación asociativa entre las variables (extractos de *Citrus sinensis*, ácido kójico y blanco) y su efecto inhibitorio o anti-tirosinasa visible en cromatografía de capa fina (decoloración).

6.3.2. Método cuantitativo

Como paso inicial se determinó el tiempo requerido de incubación a temperatura ambiente en las condiciones de ensayo (45 minutos) en el Laboratorio de Biología Molecular a partir del que se obtuvieron resultados de absorbancia estables en el tiempo (Tabla 12 y Figura 15). En el Anexo 7 se observa el cambio de coloración de las soluciones en función del tiempo (inicio, medio y final).

Tabla 12. Resultados de la absorbancia del complejo dopacromo (L-tirosina y tirosinasa) y la absorbancia del sustrato L-tirosina en función del tiempo.

Tiempo (Minutos)	Absorbancia del Complejo dopacromo (L-tirosina y tirosinasa)	Absorbancia de L-tirosina
0	0,128	0,032
2	0,131	0,034
4	0,133	0,034
6	0,135	0,034
8	0,136	0,035
10	0,137	0,035
12	0,140	0,035
14	0,139	0,035
16	0,141	0,035
18	0,143	0,036
23	0,145	0,037
28	0,146	0,037
33	0,147	0,037
38	0,147	0,036
43	0,149	0,037
48	0,149	0,038
53	0,148	0,038
58	0,149	0,039
68	0,150	0,038
78	0,150	0,038
88	0,149	0,038

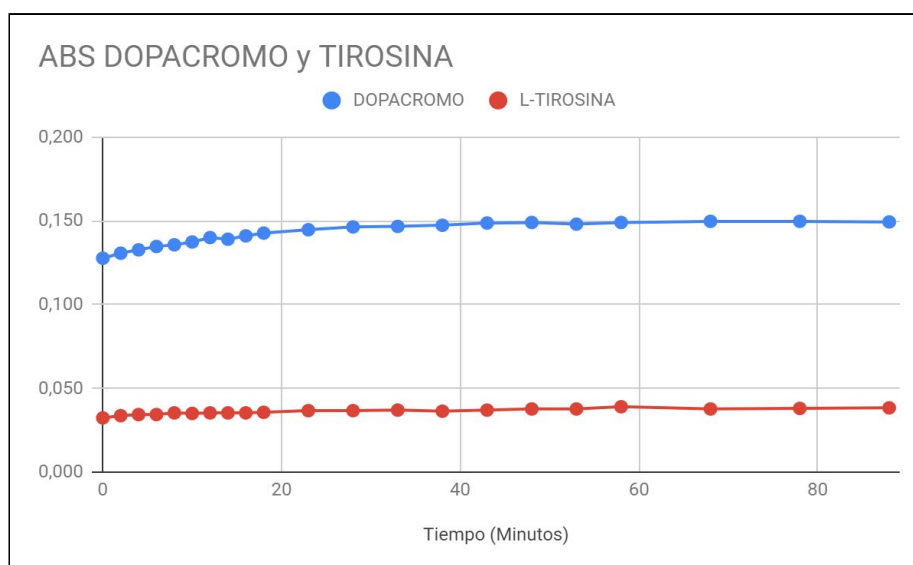


Figura 15. Absorbancia lograda por el complejo dopacromo y el sustrato de tirosina en función del tiempo.

Los datos de la medición espectrofotométrica obtenidos de acuerdo a lo señalado en la sección de Metodología punto 5.8. con los programas Excel 2013, SPSS V.25 (Anexo 8) y calculadora de IC50 (Anexo 9) se muestran en las Tablas 13, 14 y 15 para las distintas concentraciones de estándar y extracto del epicarpio de naranja preparados.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición e IC50 del estándar de ácido kójico.

Muestra Estándar	Concentración (mg/mL)	% de inhibición ± DS	IC50 (mg/mL)
Ácido kójico	0,01	12,9 ± 2,0	0,023
	0,03	64,5 ± 1,7	
	0,05	89,1 ± 2,0	
	0,10	95,3 ± 1,2	
	0,30	99,2 ± 0,7	
	0,50	103,6 ± 1,7	

Tabla 14. Efecto anti-tirosinasa e IC50 del extracto metanólico del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja).

Muestra	Concentración (mg/mL)	% de inhibición ± DS	IC50 (mg/mL)
Extracto metanólico (EM)	1,50	1,9 ± 0,8	5,23
	5,00	44,3 ± 0,3	
	12,50	89,4 ± 0,7	
	20,00	105,8 ± 2,9	

Tabla 15. Efecto anti-tirosinasa e IC50 del extracto etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja).

Muestra	Concentración (mg/mL)	% de inhibición ± DS	IC50 (mg/mL)
Extracto Etil Acetato (EEA)	0,75	8,0 ± 2,2	1,54
	1,25	32,3 ± 1,9	
	2,50	87,7 ± 2,2	
	5,00	105,4 ± 8,3	

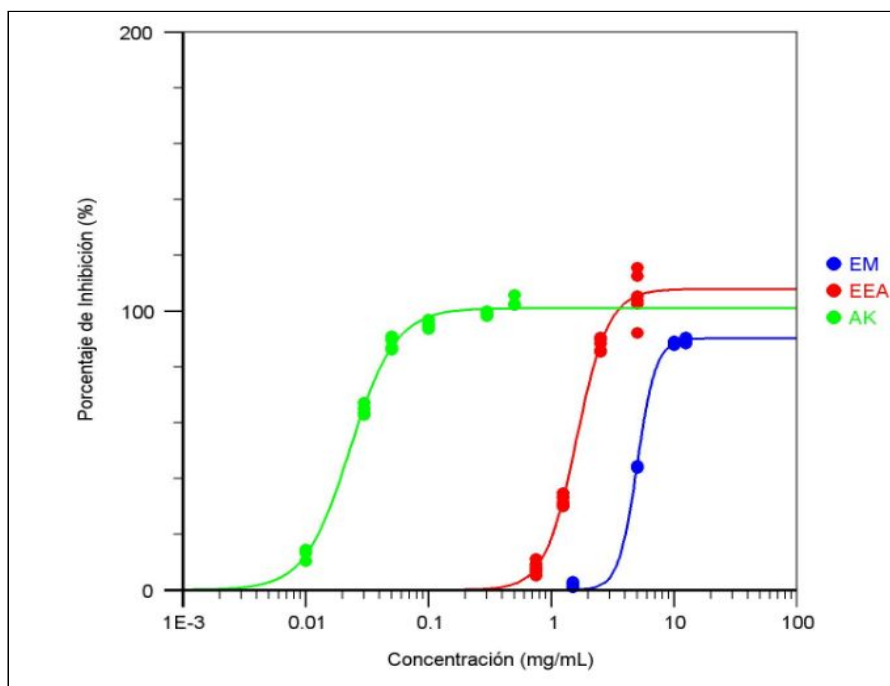


Figura 16. Curvas logarítmicas de porcentaje de Inhibición de las soluciones de trabajo versus concentración de las mismas.

Se muestra una relación logarítmica entre la concentración de las soluciones de extractos y su inhibición de la tirosinasa (efecto anti-tirosinasa) tal como sucede con el estándar de ácido kójico (Figura 16).

7. DISCUSIÓN

Las alteraciones durante la melanogénesis son responsables de ciertos trastornos del color de la piel como la hiperpigmentación e hipopigmentación. Sustancias inhibidoras de la enzima tirosinasa pueden usarse en industria cosmética para el tratamiento de la hiperpigmentación, específicamente en la hipermelanosis melasma (manchas faciales de etiología diversa), es el caso de hidroquinona, tritenoína, ácido azelaico, ácido kójico y corticosteroides todos usados debido al efecto de inhibición de la enzima tirosinasa. Asimismo, actualmente se opta por la búsqueda de fitoquímicos que no manifiesten riesgos asociados a su uso como ocurre con la hidroquinona^{70,71}.

El presente estudio confirma que los extractos metanólicos y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) presentan efecto inhibidor de la tirosinasa o efecto anti-tirosinasa sobre la enzima obtenida de hongos.

Diversos investigadores, especialmente asiáticos, se han enfocado en el uso de frutas cítricas como inhibidores de la melanogénesis especialmente por los compuestos flavonoides hallados en los residuos (cáscaras) obtenidos de la producción de zumo. Cabe resaltar que las frutas cítricas se encuentran en el primer lugar del ranking mundial de producción de frutas^{69,71,72}.

Los extractos metanólico y etil acetato de polvo del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) obtenidos mediante eliminación de lípidos con posterior maceración y evaporación rotatoria evidenció una diferencia de rendimiento entre ambos solventes: 26,8% y 0,7% respectivamente (Tabla 7). Estudios señalan variados factores que afectan el porcentaje de rendimiento de una extracción: el método, la temperatura y presión de extracción, la naturaleza de los metabolitos y la afinidad de estos por los disolventes de extracción^{71,73,74,75}. En la investigación para ambos extractos se utilizó el mismo procedimiento de

extracción variando únicamente los disolventes, por lo que la diferencia de rendimiento se atribuye a la solubilidad de los componentes del polvo de muestra en el disolvente usado.

La identificación fitoquímica de los extractos (Tabla 8) evidenció la presencia de algunos tipos de metabolitos como alcaloides, quinonas, flavonoides y polifenoles en ambos extractos, lo que concuerda con estudios fitoquímicos recientes de epicarpio de *Citrus sp* y *Citrus sinensis*^{76,77,78,79}. También se reportó la presencia de compuestos reductores (carbohidratos) presentes en el extracto etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja).

Los polifenoles son el grupo más grande de inhibidores de tirosinasa hasta ahora conocidos, éstos representan un grupo diverso de compuestos que contienen múltiples funciones y están ampliamente distribuidos en la naturaleza; entre ellos, los flavonoides se encuentran entre los polifenoles mejor estudiados debido a que su estructura fenólica los convierte en inhibidores competitivos bastante potentes. Estudios han encontrado que el epicarpio es una rica fuente de polifenoles de frutas cítricas como naranjas, limones, tangelos y mandarinas^{71,72,74,80}.

Un procedimiento de extracción similar al usado en el presente estudio fue utilizado por Cao *et al.* para extracciones metanólica y etil acetato de polvo de cáscara de naranjas y posterior identificación con cromatografía líquida de ultra-performance (UPLC), dicho procedimiento presenta alto rendimiento para compuestos flavonoides, especialmente la extracción de flavonoides con metanol (más polar) es superior a la extracción con etil acetato debido a su solubilidad⁸¹. Esta última afirmación coincide con lo obtenido en nuestro estudio de investigación ya que aplicamos un método de extracción para incrementar la solubilidad de polifenoles como flavonoides, y se evidenció la presencia de flavonoides en ambos extractos del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var.

huando (naranja) con mayor intensidad en el extracto metanólico, asimismo se indica presencia de quinonas en mayor intensidad en el extracto etil acetato.

Para determinar el efecto anti-tirosinasa de los extractos metanólico y etil acetato obtenidos se realizó una prueba enzimática de incubación sobre una superficie adsorbente. Para observar el efecto inhibitorio se aspersó la solución de enzima tirosinasa y sustrato L-tirosina sobre una placa que contenía las soluciones inhibitoras presuntas (extracto metanólico y extracto de etil acetato) junto al inhibidor comprobado (estándar de ácido kójico) de esta forma las moléculas del inhibidor presentes en la placa se unieron a la enzima formando el complejo enzima-inhibidor, dicha inhibición se visualizó como zonas incoloras en un fondo gris-violeta (área con presencia de inhibidor) para todas las réplicas de la prueba (Tabla 9). Esta técnica de determinación cualitativa y variaciones de cromatografía en capa fina (CCF) han sido usadas para la determinación de la actividad anti-tirosinasa en diversos estudios y se ha propuesto como procedimiento de bajo costo para el reconocimiento inicial del efecto anti-tirosinasa en fracciones de extractos naturales^{68,75,82}.

Es preciso mencionar que la cantidad de pruebas y el recuento de los resultados hallados en la prueba de determinación cualitativa (Tabla 10) rechazaron la hipótesis de independencia entre las variables (soluciones usadas versus efecto obtenido) mediante el estadístico de chi-cuadrado, lo que afirma que realmente existe una relación asociativa de la solución variable (extractos, ácido kójico y blanco) y su efecto inhibitorio visible (decoloración) en CCF (Tabla 11).

En el desarrollo del presente estudio se realizó previamente una verificación de la actividad enzimática de los reactivos adquiridos y se verificó el tiempo requerido para la observación directa de cambios en la coloración del complejo enzima-sustrato (Tabla 12 y Figura 15). Se utilizó una variante del procedimiento de cuantificación para dicho fin (soluciones buffer, enzima y sustrato a las mismas concentraciones con cantidades suficientes para 1 mL). Se observó que las soluciones constituidas por la enzima tirosinasa y el sustrato L-tirosina en buffer

fosfato mostraron una coloración “rosado-piel” entre los 43 y 48 minutos de iniciada la incubación a temperatura ambiente que se mantuvo hasta los 88 minutos, tiempo en el que se visualizó un viraje hacia coloración púrpura grisácea y finalmente grisácea (Anexo 6). Asimismo se evidenció que la absorbancia mostrada a 492 ηm se mantuvo estable a partir de los 43 minutos. Por su parte la solución de sustrato L-tirosina inafecta por la enzima mantuvo el aspecto traslúcido durante toda la prueba, por lo que se optó por monitorear las pruebas de determinación en capa fina, así como la espectrofotométrica a los 45 minutos de iniciada la incubación como punto final de la reacción considerando que en estudios previos se realizó el ensayo de cuantificación del complejo coloreado con medición favorable a 475, 490 y 492 ηm ^{69,72,83,84}.

Para evaluar cuantitativamente la actividad anti-tirosinasa se realizó medición espectrofotométrica a 492 ηm usando ácido kójico como control positivo, ya que ha demostrado ser una sustancia con alta actividad anti-tirosinasa, metodología de cuantificación del porcentaje de inhibición de tirosinasa ampliamente usada^{84,85,86}. Como resultado de la comparación con ácido kójico, se observó que las concentraciones útiles de estándar de ácido kójico, en las condiciones de estudio, 0,01; 0,03; 0,05 ; 0,1 ; 0,3 y 0,5 mg/mL lograron porcentajes de inhibición de 12,9 %; 64,5 %; 89,1 % ; 95,3 %; 99,2 % y 103,6 % respectivamente y los extractos del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) lograron porcentajes de inhibición similares 1,9 %; 44,3 %; 89,4 %; 105,8 % debido a extracto metanólico y 8,0 %; 32,3 %; 87,7 %; 105,4 % debido al extracto etil acetato, sin embargo dichos porcentajes se obtuvieron a concentraciones de 1,5; 5,0; 12,5 y 20,0 mg/mL para extracto metanólico y 0,75; 1,25; 2,5 y 5,0 mg/mL para etil acetato respectivamente (Tabla 13, 14 y 15).

La finalidad de determinar cuantitativamente la actividad anti-tirosinasa o porcentaje de inhibición de la tirosinasa fue hallar la concentración inhibitoria media (IC50) o concentración mínima requerida de una sustancia para dar un 50 % de inhibición de la actividad enzimática. Estudios previos han realizado la

comparación del porcentaje de inhibición de tirosinasa o del valor IC₅₀ de estándares conocidos como ácido kójico versus diversas sustancias de estudio como: extractos vegetales concentrados en flavonoides, flavonoles purificados, etc^{87,88}. Es el caso de Vardhan *et al.*⁶⁹ que reportan porcentajes de inhibición para diversas plantas entre ellas *Citrus sinensis* (fruto y cáscara) tanto para extracto metanólico (116,50 %I) como etil acetato (975,75 %I) muy superior al obtenido por ácido kójico; 65,24 %I y 96,21 % en los solventes mencionados respectivamente. Zhang *et al.*⁷² por su parte reportaron extractos de cáscara de *Citrus unshiu* con IC₅₀ de 4,80 mg/mL (extracto rico en glicósidos de flavanona); 7,53 mg/mL (extracto etanólico) y 8,09 mg/mL (extracto con éter de petróleo) versus IC₅₀ de 0,0372 mM obtenido por ácido kójico. El valor de IC₅₀ del ácido kójico en la presente investigación fue de 0,023 mg/mL, el IC₅₀ para los extractos de etil acetato y metanólico de *Citrus sinensis* resultaron: 1,54 mg/mL y 5,23 mg/mL respectivamente, haciendo evidente que una concentración menor de ácido kójico logra un efecto anti-tirosinasa mayor que el obtenido con extractos del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja).

Cabe resaltar que las concentraciones de extractos de cáscara de *Citrus sinensis* en cosméticos no se encuentran parametradas; tal como sí es el caso de la hidroquinona que se encuentra prohibida por encima de los 0,02 % (equivalente a 0,2 mg/mL) debido a su efecto carcinogénico comprobado, o el caso de ácido kójico el cual se recomienda su uso máximo a 1% (equivalente a 10 mg/mL) en formulaciones dérmicas debido a estar comprobado que sensibiliza la piel en humanos cuando se usa a concentraciones mayores⁸⁹. Asimismo, estudios previos han demostrado que los extractos de *Citrus sinensis* incluso en altas dosis se encuentran libres de efectos citotóxicos no deseados^{72,87}.

Las cáscaras de los cítricos en general poseen gran cantidad de flavonoides, algunos de estos flavonoides fueron identificados como inhibidores de la tirosinasa; ellos son la nobiletina, naringina y neohesperidina. Según Souza *et al.*⁹⁰ los compuestos flavonoides como los flavonoles y las catequinas, pueden

presentar una buena afinidad por la enzima tirosinasa. Estos compuestos, que contienen 3-hidroxi-4-ceto, 5-hidroxi-4-ceto y/o di-hidroxilo, actúan de forma competitiva con la enzima tirosinasa quelando el sitio activo de la enzima tirosinasa, lo que evita la formación de dopacromo; asimismo, estudios con estos metabolitos demostraron que su fuerza inhibitoria es menor en comparación con la inhibición que brinda el ácido kójico⁸⁶.

En el estudio realizado no fue posible establecer una relación entre la inhibición de la enzima tirosinasa y la cantidad de flavonoides, puesto que el extracto metanólico de la muestra cuantitativamente presentó menor capacidad anti-tirosinasa a pesar de evidenciar cualitativamente mayor cantidad de metabolitos polifenólicos. Podemos deducir que entre los metabolitos del extracto metanólico de epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando existen flavonoides que ejercen poco o nulo efecto inhibitor sobre la enzima tirosinasa. Este resultado es respaldado por los estudios realizados por Chang⁸⁰ en donde demuestra que el extracto etanólico de los cítricos tiene efectos inhibidores in vitro sobre la melanogénesis en células de melanoma e in vivo.

8. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) y se identificaron los siguientes metabolitos: alcaloides, quinonas, flavonoides y polifenoles.
- El efecto anti-tirosinasa (inhibitorio de la enzima tirosinasa) de los extractos metanólico y etil acetato determinado por visualización directa en cromatografía de capa fina evidenció resultados inhibitorios positivos para ambas muestras similar al obtenido con ácido kójico.
- El extracto etil acetato presentó un mejor efecto anti-tirosinasa (inhibitorio de la enzima tirosinasa) comparado al obtenido por el extracto metanólico con un valor de IC₅₀ de 1,54 mg/mL y 5,23 mg/mL respectivamente; no obstante ninguno presentó mayor inhibición que el obtenido por el ácido kójico.

9. RECOMENDACIONES

- Revisar minuciosamente la ficha técnica y certificado de análisis de los reactivos con el fin de mantener las condiciones adecuadas de almacenamiento de los reactivos en polvo y las soluciones.
- Determinar los límites de concentración de extracto de cáscara de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck para su inclusión segura en formulaciones de blanqueadores, bloqueadores solares u otras formas cosméticas.
- Evaluar el uso de extracto de cáscara de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck como inhibidor del pardeamiento enzimático en frutas y verduras.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ancillo G, Medina A. Monografías botánicas: Los cítricos. Universidad de Valencia E.G. 2014.
2. Cronquist, A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, Nueva York.1981.
3. Little E, Wadsworth F, Marrero J. Árboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes. 2 ed. San Juan: Editorial de la Universidad de Puerto Rico; 2001. p. 264-1.
4. Etebu E, Nwauzoma A. A review on sweet orange (*Citrus sinensis* L Osbeck): Health, diseases and management. Am J Res Commun. 2014; 2(2): 33-70.
5. Universidad HEARTH Centro para la Formación Empresarial. Perfil del Producto Naranja. 2004.
6. Banfi G, Casafus C, Costa N, Fabiani A, Garran S, Marco G et al. Manual para productores de Naranja y Mandarina de la región del río Uruguay. Compilado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina. 1996.
7. Baraona M, Sancho E. Fruticultura Especial: Cítricos. Fruticultura II. San José [Costa Rica] EUNED, 2000.
8. Valero T, Rodriguez P, Ruiz E, Avila J,Varela G. La alimentación española: Características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta. Madrid: Roal; 2018.
9. Ferrándiz C. Dermatología Clínica. 6 ed. Madrid: Elsevier; 2001.
10. Saladin K. Anatomy & Physiology: The unity of form and function. 6 ed. México: McGraw Hill; 2012.
11. Arenas R, Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento, 5 ed., México:Mc Graw-Hill; 2013.
12. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau J, Wong J. The dynamic anatomy and patterning of skin, Experimental Dermatology. 2016, 25: 92-98.

13. Wilkinson J, Moore R. Harry's Cosmetology. Madrid: Díaz de Santos; 1990. p. 8, p.295.
14. Donnersberger A, Lesak A. Libro de laboratorio de Anatomía y Fisiología. España:Paidotribo; 2002.
15. Lapadula M, Stengel F. El color de la piel. Algo mas que "una gota de pigmento...". Arch. Argent. Dermatol. 2006; 56: 169-175.
16. Consejo Argentino de Ciencias Estéticas. Biotipos y Fototipos Cutáneos.[en línea] Buenos Aires.[citado el 23 Ene 2019]. Disponible en:<https://caceglobal.org/wp-content/uploads/2016/02/Biotipos-cut%C3%A1neos-1.pdf>
17. Sinnatamby C. Last's Anatomy. Regional and Applied. 10 ed. Barcelona: Paidotribo; 2003.
18. Gómez AM, Naranjo D, Montoya OI, Gallego DdJ. Caracterización de un pigmento naranja producido por una cepa nativa de bacillus spp.. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 2007;38(1):55-61.
19. Repetto M, Repetto G. Toxicología fundamental. 4 ed. Madrid: Díaz de Santos; 2009.
20. Cabrera S, Lissi G, Honeyman J. Radiación ultravioleta y salud. Santiago [Chile]: Universitaria; 2005.
21. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. Postep Derm Alergol. 2013; 30(1): 30-41.
22. Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira JA, Topilko P, Müller T, et al. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. Cell. 2009 Oct.; 139, 366–379.
23. Haass NK, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 2005;10(2):153–163.
24. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte Function and Its Control by Melanocortin Peptides. J HistochemCytochem. 2002; 50(2): 125–133.

25. Mora P. Los Melanocitos: Función y su control por melanocortinas. [Tesis de grado en Farmacia]. España: Universidad de La Laguna, Departamento de Bioquímica, Microbiología Celular y Genética; 2017.
26. Montaudié H, Bertolotto C, Ballotti R, Passeron T. Fisiología del sistema pigmentario. Melanogénesis. EMC - Dermatología. 2014; 48(1).
27. Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Leffell D. Fitzpatrick. Dermatología en medicina general. 7 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
28. Buendía A, Mazuecos J, Camacho J. Anatomía y fisiología de la piel. En: Conejo-Mir J, Camacho F, Moreno J.C. Manual de dermatología. 2 ed. España: Aula Médica; 2018: vol. 1 p. 2-27.
29. Sulaimon S, Kitchell B. The biology of melanocytes. Vet Dermatol. 2003, 14, 57–65.
30. Weston W, Lane A, Morelli J. Dermatología pediátrica. Texto y atlas a color. 4 ed. Barcelona: Elsevier; 2008.
31. Solari J. Genética humana: fundamentos y aplicaciones en Medicina. 3 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
32. Shabani F, Sariri R. Increase of Melanogenesis in the Presence of Fatty Acids. Pharmacologyonline. 2010; 1: 314-9.
33. Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H, Sugiyama M. Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. J Biol Chem. 2006; 281 (13): 8981-8990.
34. Rolff M, Schottenheim J, Decker H, Tuczec F. Copper–O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. Chem. Soc. Rev., 2011; 40: 4077–4098.
35. Solomon I, Sundaram U, Machonkin T. Multicopper Oxidases and Oxygenases. Chem. Rev. 1996; 96: 2563–260.
36. Van Gelder C, Flurkey W y Wichers H. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. Phytochemistry. 1997; 45 (7): 1309-14.

37. Klabunde T, Eicken C, Sacchettini JC, Krebs B: Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Mol Biol.* 1998; 5: 1084-6.
38. D'Mello S, Finlay G, Baguley B, y Askarian-Amiri M. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul; 17 (7): 1144.
39. Sáenz EM. Relación de la pigmentación con la inmunidad. [Trabajo de fin de grado Biología]. España: Universidad del País Vasco, Facultad de Ciencia y Tecnología; 2015.
40. Jimenez Lancho V. Estudio de la capacidad antioxidante, melanogénica y fotoprotectora de 5 extractos vegetales. [en línea] [Tesis de Grado de biotecnología] España: Universidad Miguel Hernández de Elche. Facultad de Ciencias Experimentales; 2017. [citado 5 Mar 2019]. Disponible en: <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/4169/1/TFG%20Jim%C3%A9nez%20Lancho%2C%20Victor.pdf>
41. Mercadillo P, Moreno LM. Fisiopatología del melasma. *Dermatología CMQ.* Sep 2010; 8(3): 210-7.
42. Wolff K, Johnson R, Saavedra A. Fitzpatrick. Atlas en Dermatología Clínica. 7 ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2014.
43. Arenas R. La piel. En *Dermatología: Atlas, Diagnóstico y Tratamiento*. 3 ed. México: McGraw-Hill / Interamericana; 2005.
44. Acosta X. Conocimiento sobre prácticas de fotoprotección e identificación del fototipo cutáneo en población de 18 a 40 años de edad del personal de la policía Nacional de Ibarra. [Tesis de título de Médico Cirujano]. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Medicina; 2016.
45. Serna J, Vitales M, López M, Molina A. *Dermatología*. Barcelona: Médica Panamericana; 2001.
46. López D, Pujol R. Trastornos de la pigmentación de la piel [en línea]. Barcelona: 2011 [citado 6 Mar 2019]. Disponible en: <http://dermatoweb2.udl.es/seminarios.php?idsubmenu=2640>

47. Aguado L, Pretel M, Irarrazaval I, Lera JM. Protocolo diagnóstico de las alteraciones de la pigmentación, Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. Feb 2014; 11(48): 2852-5.
48. Trastornos y alteraciones de la pigmentación de la piel [en línea]. Madrid: El periódico de la farmacia; 2011 [actualizado 14 Oct 2011; citado 20 Mar 2019]. Disponible en: <http://www.elperiodicodelafarmacia.com/articulo/enfermedades-y-trastornos/trastornos-y-alteraciones-pigmentacion-piel/20111014155440003020.html>
49. Peyri J. Alteraciones de la pigmentación cutánea. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en dermatología pediátrica. 2011; 103-8.
50. González N, Robles JC, Ocampo J. Artículo de revisión: hiperpigmentaciones adquiridas. DermatologíaCMQ. 2017; 16(1): 50-12.
51. Bolognia L, Schaffer J. Cerroni L. Dermatología. 4 ed. Barcelona: Elsevier; 2019.
52. Bello A. Trastornos de la pigmentación (I): Causas y tipos. [en línea]. Madrid. Nov 2014 [citado 12 Mar 2019]. Disponible en: <https://www.quironsalud.es/blogs/es/piel-protege-cuidala/trastornos-pigmentacion-i-causas-tipos>
53. Anco-Gallegos K, Sánchez L, Sanz M. Nevus de Becker segmentario asimétrico unilateral. DermatolPeru 2018; 28 (1):41-43.
54. Lemmel J. Sustancias despigmentantes y métodos de aclaramiento del color de la piel. [en línea]. 2005. [citado 15 Mar 2019]. Disponible en: http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?f=10&pidet_articulo=13038004&pidet_usuario=0&pidet_revista=4&fichero=4v21n09a13038004pdf001.pdf&ty=109&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es
55. Porat K. Etiología, clínica y manejo del melasma. Rev Med Cos Cen 2011; 68 (596).
56. Arellano I, Arias I, Barba J, Elizondo A, García A, Garza A, et al. Melasma: Consenso del Grupo Mexicano para el Estudio de los Trastornos Pigmentarios. DermatologíaCMQ2007; 5(2): 112-10.

57. González L. Sustancias despigmentantes. OFFARM; Set 2001; 113-3.
58. Melo V, Melo V, Cuamatzi O. Bioquímica de los procesos metabólicos. Reverte; 2007.
59. Merino J, Noriega MJ. Fisiología General. Universidad de Cantabria, Departamento de Fisiología y Farmacología; 2011.
60. Voet D, Voet JG. Bioquímica. 3 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006: p 487.
61. Devlin T. Bioquímica Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4 ed. Barcelona: Reverté; 2006.
62. Peña A, Arroyo A, Gómez A, Tapia R. Gómez C. Bioquímica. México: Limusa; 2004.
63. McKee T, McKee J. Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. 5ed. México: Interamericana; 2014.
64. Vasudevan DM, Sreekumari S, Vaidyanathan K. Texto de Bioquímica para Estudiantes de Medicina. 6 ed. Guadalajara: Cuellar Ayala; 2011.
65. Khan Academy. Regulación Enzimática. [en línea]. [citado 18 Mar 2019]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/energy-and-enzymes/enzyme-regulation/a/basics-of-enzyme-kinetics-graphs>
66. Casañola G, Marrero Y, Le H, Khan MTH, Torrens F, Rescigno A, Abad C. La enzima tirosinasa: 2. Inhibidores de origen natural y sintético. Afinidad LXX [en línea] 2013 [citado 21 Feb 2019] 564: 270-276. Disponible en: file:///C:/Users/FFB-LABINFOPC27/Downloads/273744-373579-1-SM%20(1).pdf
67. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello. 2000; 78.
68. Wangthong S, Tonsiripakdee I, Monhaphol T, Nonthabenjawan R, Pattanaargson S. Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor detection. Biomed Chromatogr. 2007; 21: 94–100.

69. Vardhan A, Khan S, Pandey B. Screening of plant parts for anti-tyrosinase activity by tyrosinase assay using mushroom tyrosinase. *Indian J Sci Res.* 2014; 4(1): 134-5.
70. Gupta A, Gover M, Nouri K, Taylor S. The treatment of melasma: A review of clinical trials. *J Am Acad Dermatol.* Oct 2006; 55(6): 1048-17.
71. Kim SS, Kim MJ, Choi YH, Kim BK, Kim KS, Park KJ et al. Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pac J Trop Biomed.* Ago 2013; 3(8): 617-22.
72. Zhang C, Lu Y, Tao L, Tao X, Su X, Wei D. Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts. *J Enzyme Inhib Med Chem.* Feb 2007; 22(1): 91–7.
73. Gutiérrez P, Rojano B. Docking de cicloartanos inhibidores de tirosinasa. *Vitae.* Ene 2009; 16(2): 245-251.
74. Tenorio M. Flavonoides extraídos de la cáscara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sachá inchi (*Plukenetia volubilis*). *Scientia Agropecuaria.* 2016; 7 (4): 419 – 12.
75. Agustín A, Calderón M, Martínez A, Ortiz J. Actividades antitirosinasa de ocho especies de plantas nativas de Mesoamérica usadas en aplicaciones dérmica. [Tesis de Químicos Biólogos]. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2015.
76. Okwu D, Awurum A, Okoronkwo J. Phytochemical composition and in vitro antifungal activity screening of extracts from citrus plants against *Fusarium oxysporum* of okra plant (*Hibiscus esculentus*). *Summa Phytopathol.* Oct 2007; 30: 145-148.
77. Ibejekwe A, Nyam. The efficacy of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) osbeck) peels in the preservation of plain cake at ambient temperature. *J Nutr Health Food Eng.* Mar 2019; 8: 199 - 203.

78. Ilyas S. The Effectiveness of Botanical Insecticides of Four Plant Types and Adjuvants on Nutrition Index of The Fifth Instar Larvae of *Heliothis Armigera* Hubner. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Jul 2019; 305(1): 012047.
79. Asowata-Ayodele M, Dabesor P, Afolabi B. Phytochemical Compositions and Antimicrobial Activities of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia* Peels on Selected Pathogenic Bacteria Isolated from Jollof Rice. International Journal of Pathogen Research. May 2019; 2(3): 1-7.
80. Chang TS. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. Int. J. Mol. Sci. May 2009; 10: 2440-35.
81. Cao W, Hu SS, Li HY, Cao J, Pang XQ, Xu JJ. Trace matrix solid phase dispersion using a molecular sieve as the sorbent for the determination of flavonoids in fruit peels by ultra-performance liquid chromatography. Food Chemistry. Ene 2016; 190: 474-6.
82. García P, Ramallo A, Furlan R. Reverse phase compatible TLC - bioautography for detection of tyrosinase inhibitors. Phytochem Anal 2017; 28: 101-5.
83. Chen QX, Kubo I. Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin. J Agric. Food Chem. 2002; 50(14): 4108-5.
84. Kamkaen N, Mulsri N, Treesak C. Screening of some tropical vegetables for anti-tyrosinase activity. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal. 2007; 2: 15-4.
85. Malik W, Ahmed D, Izhar S. Tyrosinase inhibitory activities of *Carissa opaca* Stapf ex haines roots extracts and their phytochemical analysis. Phcog Mag 2017; 13 Suppl S3: 544-8.
86. Kim JH, Kim HY, Kang SY, Kim JB, Kim YH, Jin CH. Chemical constituents from *apios americana* and their inhibitory activity on tyrosinase. Molecules. Ene 2018; 23.

87. Wang HM, Chen CY, Wen ZH. Identifying melanogenesis inhibitors from *Cinnamomum subavenium* with in vitro and in vivo screening systems by targeting the human tyrosinase. *Exp Dermatol*. Mar 2011; 20(3): 242-8.
88. Lin YS, Chen HJ, Huang JP, Lee PC, Tsai CR, Hsu TF et al. Kinetics of tyrosinase inhibitory activity using *Vitis vinifera* leaf extracts. *Biomed Res Int*. 2017; 2017.
89. Internal market, industry, entrepreneurship and SMEs: simple search. [en línea]. Bruselas: Comision Europea. [citado 22 Abr 2019]. Simple search; [aprox. 2 pant.]. Disponible en: <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.simple>.
90. Souza PM, Elias ST, Simeoni LA, de Paula JE, Gomes SM, et al. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. *PLoS Uno*. Nov 2012; 7 (11).

ANEXO 1

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C.B.P. N° 3796
Tel: 17512863 RPM 963689079
E-mail: joramde@gmail.com



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

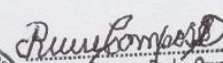
Que, JANETH MILAGROS QUISPE DEL CAMPO y MERCEDES ELIZABETH CONDO RAMIREZ, con grado académico de Bachiller, egresadas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación, han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta de naranja procedente de la provincia de Huaral departamento de Lima, donde es conocida con el nombre vulgar de “**naranja de huando**”, la muestra fértil ha sido estudiada y determinada que pertenece a la especie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y a la variedad agronómica *Citrus sinensis* (L.) Osbeck **Var huando**. Según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Rosidae
ORDEN	: Sapindales
FAMILIA	: Rutaceae
GENERO	: <i>Citrus</i>
ESPECIE	: <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck

Variedad agronómica: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck **Var. huando**.

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 07 de febrero del 2019


José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva # 156-2do piso – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 / e-mail: joricampos@yahoo.es

ANEXO 2


Evidencia fotográfica del material botánico enviado a identificación taxonómica*: planta completa, fruto y hojas.



*Ejemplar usado en la siembra común de naranja huando, Huaral, departamento de Lima

ANEXO 3

Certificados de análisis y fichas de seguridad de los principales reactivos usados:

SIGMA-ALDRICH®		3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com
Certificate of Analysis		
Product Name:	KOJIC ACID analytical standard	
Product Number:	95197	
Batch Number:	BCBV1841	
Brand:	Sigma-Aldrich	
CAS Number:	501-30-4	
Formula:	$C_6H_6O_4$	
Formula Weight:	142.11	
Expiration Date:	APR 2021	
Quality Release Date:	02 MAY 2017	
TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO LIGHT YELLOW AND FAINT BEIGE TO LIGHT BEIGE AND FAINT BROWN TO LIGHT BROWN	FAINT YELLOW
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 99.0 %	100.0 %
CARBON CONTENT	50.71 % (THEORY)	50.39 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
		
Dr. Claudia Geitner Manager Quality Control Buchs, Switzerland		
<p>Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.</p>		
Sigma-Aldrich	Certificate of Analysis - Product 95197 Lot BCBV1841	Page 1 of 1

Certificate of Analysis

Product Name:

Tyrosinase from mushroom – lyophilized powder, ≥ 1000 unit/mg solid

Product Number: T3824
Batch Number: SLEBM7158V
Brand: SIGMA
CAS Number: 9002-10-2
MDL Number: MFCD00082118
Storage Temperature: Store at -20 °C
Quality Release Date: 05 MAY 2015
Date Retested: 21 FEB 2018
Recommended Retest Date: FEB 2021

Test	Specification	Result
units/mg Solid Tyrosinase Activity Unit Definition: One unit will cause an increase in A280 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 3 mL reaction mix containing L-tyrosine	≥ 1000	2687
units/mg Solid Polyphenol Oxidase Activity Unit Definition: One unit will cause a decrease in A265 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C. In a 3 mL reaction mixture containing L-Beta-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA)	≥ 30000	44828
units/mg Solid Catechol Oxidase Activity Unit Definition: One unit will cause a decrease in A265 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 3 mL reaction mixture containing catechol and ascorbic acid	≥ 30000	180983

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Certificate of Analysis

Product Number: T3824
Batch Number: SLBM7158V



Rodney Burbach, Manager
Analytical Services
St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

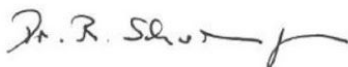
Certificate of Analysis

Product Name: L-TYROSINE
Product Number: 93829
Batch Number: BCBW7745
Brand: Sigma
CAS Number: 60-18-4
Formula: 4-(HO)C₆H₄CH₂CH(NH₂)CO₂H
Formula Weight: 181.19
Quality Release Date: 17 APR 2018
Recommended Retest Date: AUG 2022

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS OR WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS	POWDER
TITRATION (NT) HClO ₄ 0.1M	99.0 - 101.0 %	99.1 %
PURITY (TLC AREA %)	≥ 99.7 %	100.0 %
SPECIFIC ROTATION (20/D)	-11.5 ± 1.0 DEGREES	-11.5 DEGREES
CONCENTRATION	C=4 IN HYDROCHLORIC ACID 1M	C=4 IN HYDROCHLORIC ACID 1M
LOSS ON DRYING	≤ 0.2 %	0.05 %
RESIDUE ON IGNITION	≤ 0.1 %	0.1 %
CARBON CONTENT	59.66 % (THEORY)	59.48 %
HYDROGEN CONTENT	6.12 % (THEORY)	6.14 %
NITROGEN CONTENT	7.93 % (THEORY)	7.76 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
METAL TRACE ANALYSIS (ICP)	CORRESPONDS TO REQUIREMENTS	PASSED
ALUMINIUM (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
BARIUM (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
BISMUTH (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
CALCIUM (ICP)	≤ 10 MG/KG	< 10 MG/KG
CADMIUM (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
COBALT (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
CHROMIUM (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
COPPER (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
IRON (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
POTASSIUM (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
LITHIUM (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
MAGNESIUM (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG

Certificate of Analysis

MANGANESE (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
MOLYBDENUM (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
SODIUM (ICP)	≤ 200 MG/KG	< 200 MG/KG
NICKEL (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
LEAD (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
STRONTIUM (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
ZINC (ICP)	≤ 5 MG/KG	< 5 MG/KG
ARSENIC TRACES (MHS-AAS)	≤ 0.1 MG/KG	< 0.1 MG/KG
TOTAL SULFUR AS SO ₄ (ICP)	≤ 300 MG/KG	< 300 MG/KG
CHLORIDE (CL)	≤ 400 MG/KG	< 400 MG/KG
ION CHROMATOGRAPHY (NH ₄ ⁺)	≤ 200 MG/KG	< 200 MG/KG
SOLUBILITY (METHOD)	—	750 MG IN 30 ML 1M HCL, HOT
APPEARANCE (SOLUTION)	CLEAR COLORLESS	CLEAR COLORLESS
RESIDUE (FILTER TEST)	NO RESIDUE	NO RESIDUE
CUT-OFF	MAX. 310 NM	295.9 NM



Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland

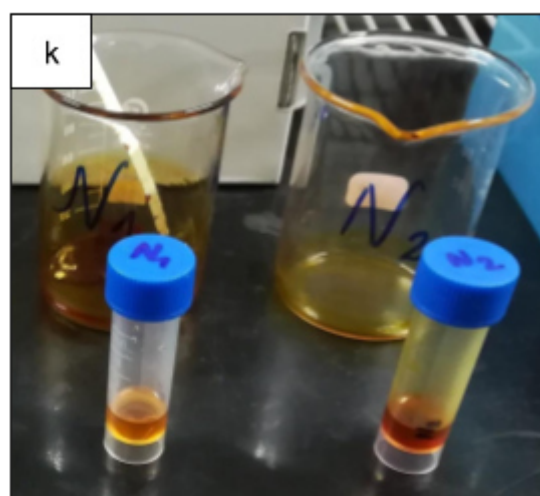
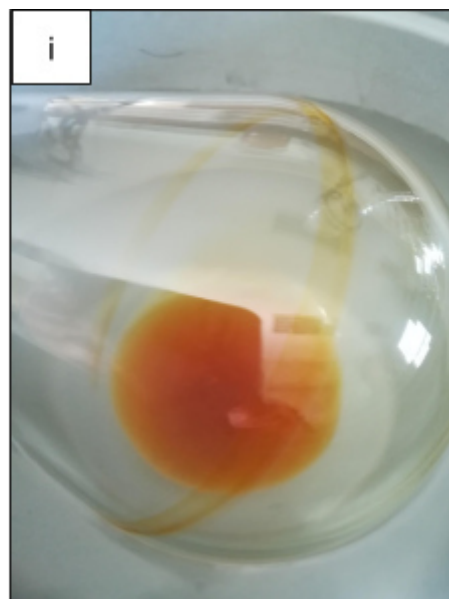
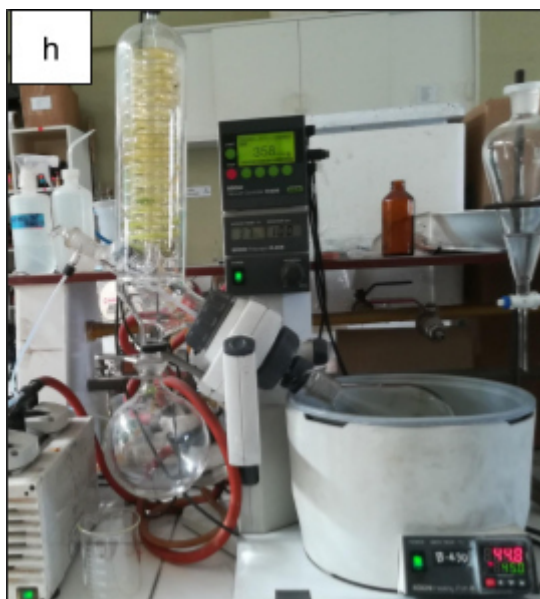
Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

ANEXO 4

Evidencia fotográfica del tratamiento del material botánico y preparación de extractos.



- a. Naranjas huando (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando) limpias previo al rallado de su epicarpio.
- b. Epicarpio de naranja rallada.
- c. Epicarpio de naranja seca.
- d. Pulverización del epicarpio de la naranja.
- e. Eliminación de pigmentos y lípidos de la muestra en polvo, sistema de Soxhlet.
- f. Muestra en cartucho libre de lípidos.
- g. Maceración de la muestra en solventes metanol y etil acetato.

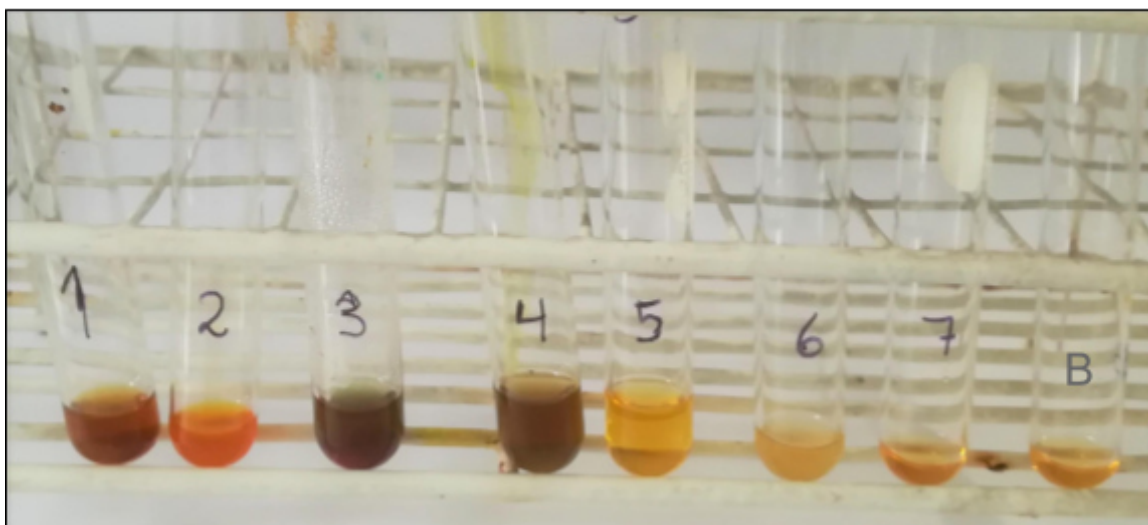


- h. Rotaevaporación del extracto obtenido.
- i. Residuo de la rotaevaporación.
- j. Colecta de residuos de rotaevaporación.
- k. Extractos metanólico y etil acetato secos y resuspendidos para análisis.

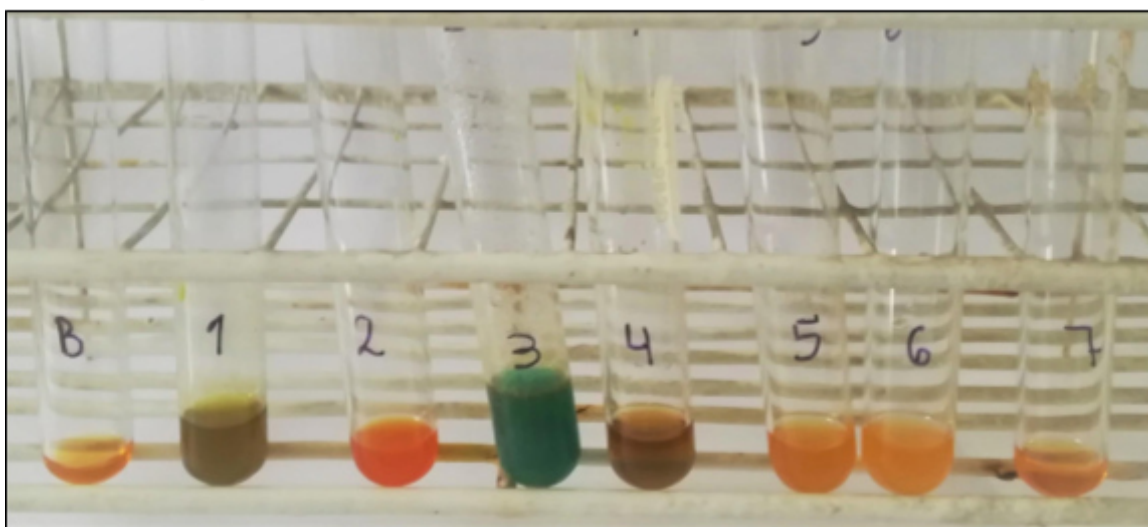
ANEXO 5

Evidencia fotográfica de la identificación fitoquímica de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja).

Marcha fitoquímica del extracto metanólico:



Marcha fitoquímica del extracto etil acetato:



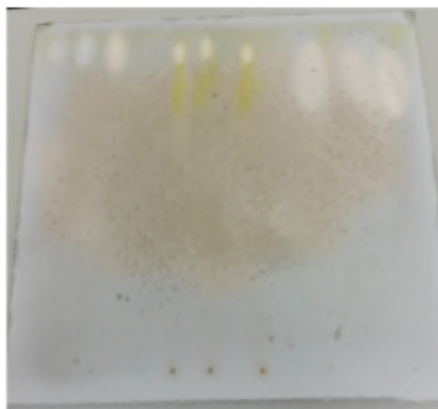
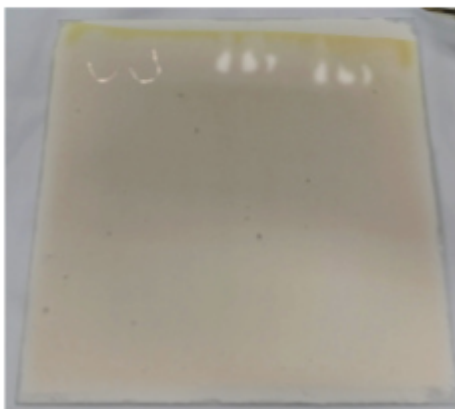
Ensayos realizadas según número de tubo:

1. Shinoda (Flavonoides)
2. Dragendorff (Alcaloides)
3. Fehling (Compuestos reductores, carbohidratos)
4. Cloruro férrico (Polifenoles)
5. Bornträger (Quinonas)
6. Mayer (Alcaloides)
7. Espuma (Saponinas)

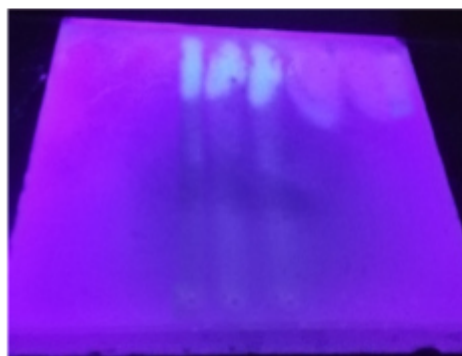
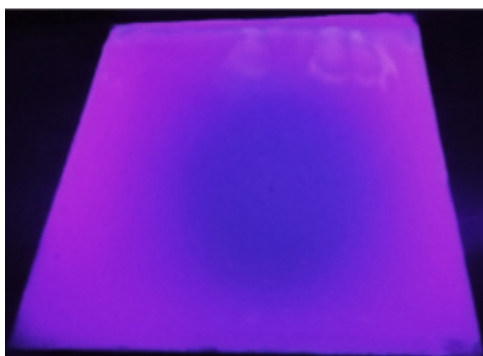
ANEXO 6

Desarrollo de la Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Vista de las placas con decoloraciones sobre fondo oscuro.



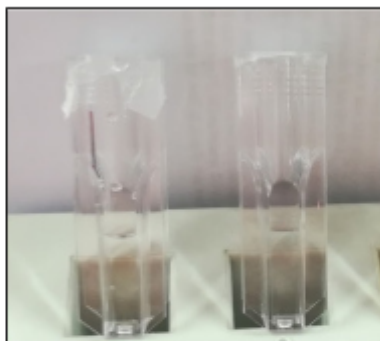
Vista de las placas bajo luz UV



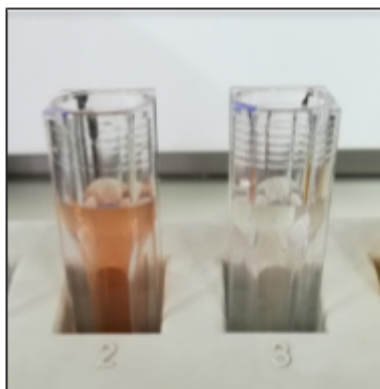
ANEXO 7

Evidencia fotográfica de la evaluación espectrofotométrica y visual del complejo Enzima-Sustrato en función del tiempo.

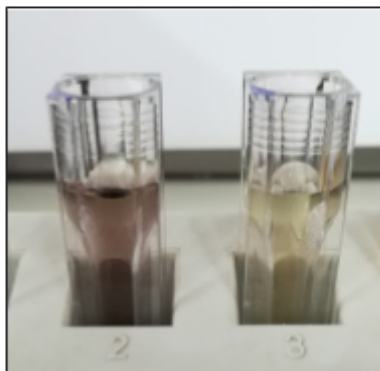
Soluciones de Enzima-Sustrato y Sustrato al inicio de la incubación:



Soluciones de Enzima-Sustrato y Sustrato a los 48 minutos de la incubación:



Soluciones de Enzima-Sustrato y Sustrato a los 78 minutos de la incubación:



ANEXO 8

Análisis estadístico de los resultados del ensayo cualitativo y cuantitativo:

1. Resultados de ensayo cualitativo (CCF) mediante el estadístico chi cuadrado y gráfica de recuento de resultados obtenidos.

Tablas cruzadas

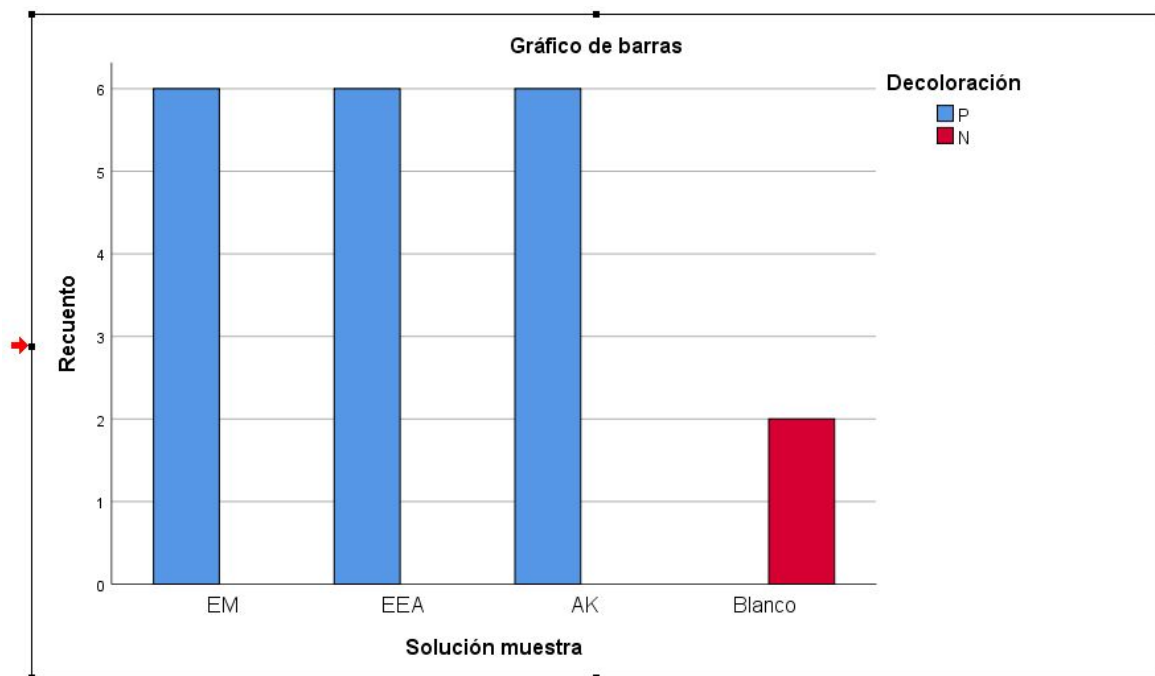
[ConjuntoDatos2] C:\Users\ACER\Downloads\Capa fina y chi cuadrado.sav

Resumen de procesamiento de casos						
	Válido		Casos Perdido		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Solución muestra * Decoloración	20	100,0%	0	0,0%	20	100,0%

Tabla cruzada Solución muestra*Decoloración				
Recuento				
		Decoloración		Total
		P	N	
Solución muestra	EM	6	0	6
	EEA	6	0	6
	AK	6	0	6
	Blanco	0	2	2
Total		18	2	20

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	20,000 ^a	3	,000
Razón de verosimilitud	13,003	3	,005
Asociación lineal por lineal	7,125	1	,008
N de casos válidos	20		

a. 5 casillas (62,5%) han esperado un recuento menor que 5.
El recuento mínimo esperado es ,20.



2. Resultados de ensayo cuantitativo (porcentaje de inhibición de la tirosinasa) mediante el estadístico anova post hoc DMS y gráfica de perfil de resultados obtenidos.

Análisis univariado de varianza

Factores inter-sujetos			
		Etiqueta de valor	N
Solución Muestra	1	EM	24
	2	EEA	24
	3	AK	36
Concentración en mg/mL	,010		6
	,030		6
	,050		6
	,100		6
	,300		6
	,500		6
	,750		6
	1,250		6
	1,500		6
	2,500		6
	5,000		12
	12,500		6
	20,000		6

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: Porcentaje de Inhibición

Solución Muestra	Concentración en mg/mL	Media	Desv. Desviación	N
EM	1,500	1,917	,8085	6
	5,000	44,300	,3225	6
	12,500	89,417	,7910	6
	20,000	105,750	2,9324	6
	Total	60,346	41,4511	24
EEA	,750	8,000	2,1781	6
	1,250	32,317	1,8519	6
	2,500	87,683	2,2203	6
	5,000	105,400	8,2663	6
	Total	58,350	40,7160	24
AK	,010	12,867	1,9846	6
	,030	64,517	1,6999	6
	,050	89,117	2,0183	6
	,100	95,250	1,1845	6
	,300	99,200	,6870	6
	,500	103,600	1,7135	6
	Total	77,425	31,9675	36
Total	,010	12,867	1,9846	6
	,030	64,517	1,6999	6
	,050	89,117	2,0183	6
	,100	95,250	1,1845	6
	,300	99,200	,6870	6
	,500	103,600	1,7135	6
	,750	8,000	2,1781	6
	1,250	32,317	1,8519	6
	1,500	1,917	,8085	6
	2,500	87,683	2,2203	6
	5,000	74,850	32,3922	12
	12,500	89,417	,7910	6
	20,000	105,750	2,9324	6
	Total	67,095	38,0528	84

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error^{a,b}

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Porcentaje de Inhibición	Se basa en la media	4,072	13	70	,000
	Se basa en la mediana	3,401	13	70	,000
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	3,401	13	11,991	,021
	Se basa en la media recortada	4,168	13	70	,000

Prueba la hipótesis nula de que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Variable dependiente: Porcentaje de Inhibición

b. Diseño : Intersección + Muestra + Conc_mg/mL + Muestra * Conc_mg/mL

Pruebas post hoc

Solución Muestra

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Porcentaje de Inhibición

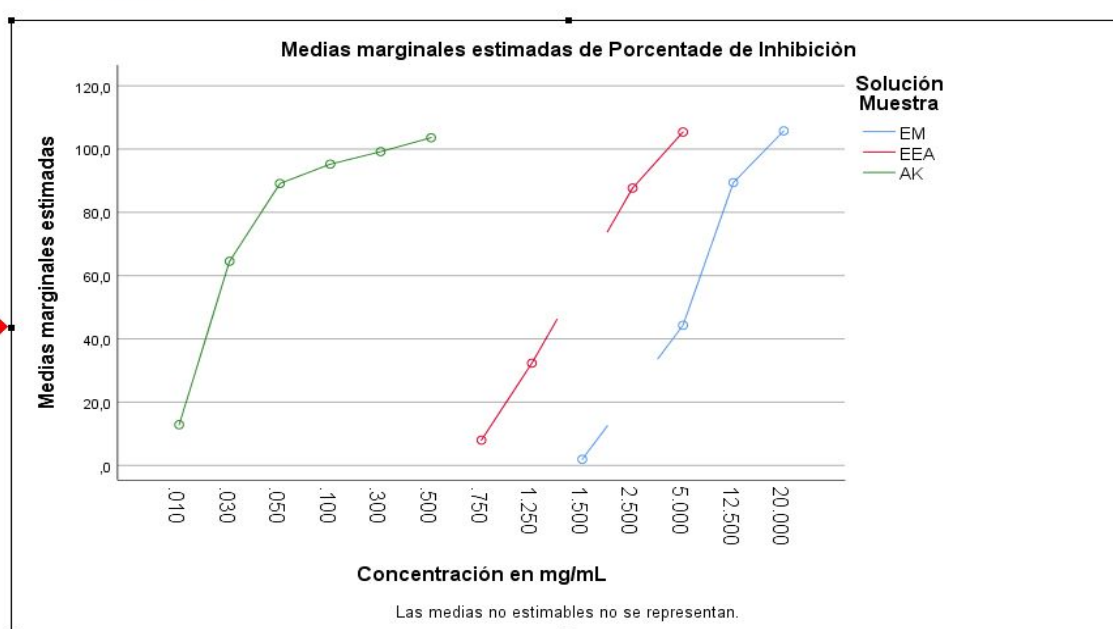
						Intervalo de confianza al 95%	
		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Límite inferior	Límite superior	
(I) Solución Muestra	(J) Solución Muestra						
DMS	EM	EEA	1,996*	,7986	,015	,403	3,588
		AK	-17,079*	,7290	,000	-18,533	-15,625
	EEA	EM	-1,996*	,7986	,015	-3,588	-,403
		AK	-19,075*	,7290	,000	-20,529	-17,621
	AK	EM	17,079*	,7290	,000	15,625	18,533
		EEA	19,075*	,7290	,000	17,621	20,529

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 7,652.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

Gráficos de perfil



ANEXO 9

Se realizó el cálculo de IC50 mediante programa online para estudiantes disponible en la siguiente dirección: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>

Se ingresaron los datos de Concentración y Respuesta (Porcentaje de inhibición) lograda por cada solución de muestra:

DATOS INGRESADOS PARA EXTRACTO METANÓLICO (EM)

Concentration	Response 1
1.5	1
1.5	3.1
1.5	1.4
1.5	2.4
1.5	1.3
1.5	2.3
5	44.4
5	43.9
5	44.6
5	44.4
5	43.9
5	44.6
12.5	89.4
12.5	88.4
12.5	89.6
12.5	88.7
12.5	89.8
12.5	90.6
20	107.8
20	100
20	105.7
20	106.4
20	107.8
20	106.8

DATOS INGRESADOS PARA EXTRACTO ETIL ACETATO (EEA)

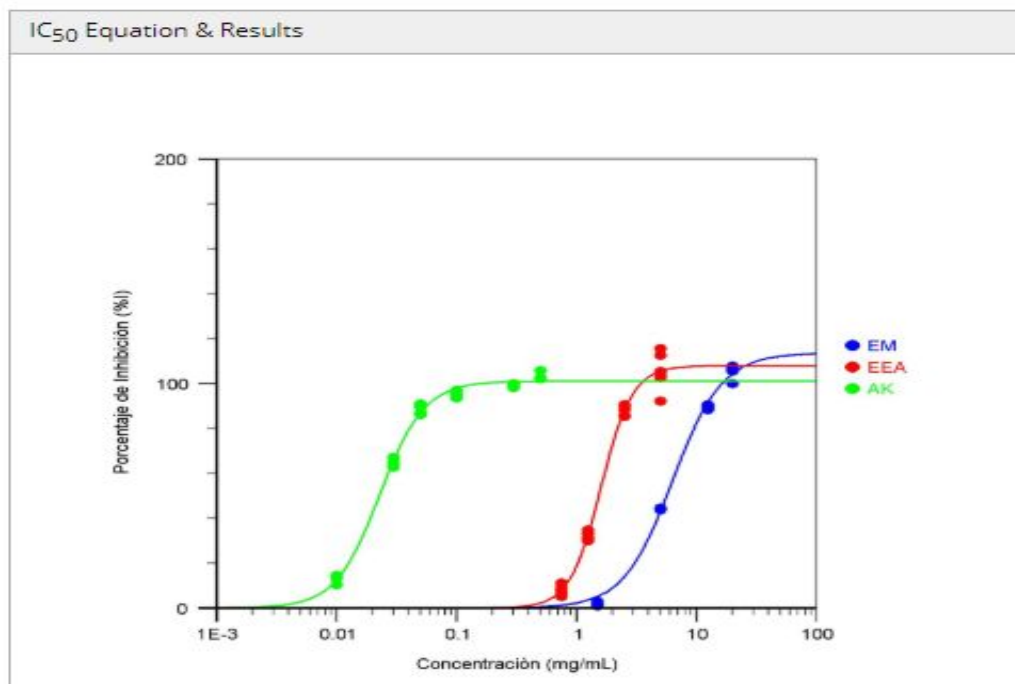
Concentration	Response 1
0.75	7.2
0.75	11.3
0.75	6.4
0.75	9.5
0.75	5.3
0.75	8.3
2.5	85.5
2.5	88.4
2.5	85.8
2.5	90.6
2.5	86
2.5	89.8
5	115.6
5	92.2
5	112.7
5	105.4
5	103.9
5	102.6
1.25	31.5
1.25	30
1.25	33.3
1.25	34.9
1.25	33.4
1.25	30.8

DATOS INGRESADOS PARA ESTÁNDAR DE ÁCIDO KÓJICO (AK)

Concentration	Response 1
0.01	10.4
0.01	14.7
0.01	13.5
0.01	10.4
0.01	14.7
0.01	13.5
0.03	67.3
0.03	62.9
0.03	62.9
0.03	65.2
0.03	65.1
0.03	63.7
0.05	89.6
0.05	87
0.05	86.2
0.05	90.6
0.05	90.3
0.05	91
0.1	95.7
0.1	95.6
0.1	94.3
0.1	93.6
0.1	95.3
0.1	97
0.3	100
0.3	100
0.3	99.1
0.3	98.3
0.3	99.1
0.3	98.7
0.5	102.7
0.5	102.7
0.5	102.3
0.5	105.8
0.5	102.3
0.5	105.8

Graph Options	
X-Axis Label	Concentración (mg/mL)
Y-Axis Label	Porcentaje de Inhibición (%)
Title	(Optional)
Display error bars	<input checked="" type="checkbox"/>
Set minimum response to zero (0)	<input checked="" type="checkbox"/>

Calculate IC₅₀



Ecuaciones de las curvas logarítmicas de cada solución para el cálculo de IC₅₀ y su comprobación matemática (se ingresó valores de Y=50 para hallar el valor IC₅₀ y se comprobó "Y" ingresando valores de X = IC₅₀):

EXTRACTO METANÓLICO (EM)

$$y = 0.000 + \frac{(113.508 - 0.000)}{1 + \left(\frac{x}{6.350}\right)^{-2.115}}$$

Enter X below to calculate Y	Enter Y below to calculate X
5.67	50
5.67	49.99

EXTRACTO ETIL ACETATO (EEA)

$$y = 0.000 + \frac{(107.854 - 0.000)}{1 + \left(\frac{x}{1.611}\right)^{-3.333}}$$

Enter X below to calculate Y	Enter Y below to calculate X
1.54	50
1.54	49.91

EXTRACTO ÁCIDO KÓJICO (AK)

$$y = 0.000 + \frac{(100.983 - 0.000)}{1 + \left(\frac{x}{0.023}\right)^{-2.343}}$$

Enter X below to calculate Y	Enter Y below to calculate X
0.023	50
0.023	50.32